

**EL SEÑAL
BIOELECTROQUÍMICO
PRODUCIDO POR UNA PILA
MICROBIANA COMO
INDICADOR DE LA
ACTIVIDAD BACTERIANA
DURANTE EL TRATAMIENTO
DE AGUAS RESIDUALES**

Trabajo realizado por:
Marta Fernández Gatell

Dirigido por:
Jaume Puigagut Juárez

Máster en:
Ingeniería Ambiental

Barcelona, **setiembre 2018**

Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental
Grupo en Ingeniería Ambiental y Microbiología

RESUMEN

Los humedales construidos de flujo subsuperficial horizontal (HSSF CW) representan una alternativa a los sistemas intensivos convencionales de saneamiento del agua residual, especialmente en países en desarrollo y pequeñas comunidades. Gracias al gradiente redox natural que se genera entre la capa superior y las inferiores, los HSSF CW constituyen un ambiente idóneo en el que pueden implementarse las pilas microbianas (MFC). La combinación de ambas tecnologías (CW-MFC) puede conllevar ventajas como un pequeño suministro de energía, mejoras en la eliminación de contaminantes o una herramienta de monitoreo in-situ y en continuo

Es en este último aspecto al que pretende contribuir el trabajo, con el objetivo de determinar si la corriente eléctrica generada por los microorganismos exoelectrógenos de una pila microbiana implementada en un humedal construido puede ser un parámetro indicador indirecto de la actividad general de un HSSF durante el tratamiento del agua residual.

Para abordar este objetivo se ha separado el trabajo en dos partes. En la primera, se han usado cuatro sistemas escala laboratorio alimentados en *batch* con agua residual doméstica real bajo diferentes condiciones operacionales, simulando el interior de un humedal. El objetivo de esta parte ha sido determinar si la hidrólisis del FDA puede ser usada para evaluar la actividad microbiana general y, en caso afirmativo, validar si la generación de corriente por una MFC puede ser usada como indicador de la actividad heterotrófica. En la segunda parte del trabajo se ha usado un humedal construido (alimentado en continuo con agua residual doméstica real) en el que hay implementadas tres MFCs coincidiendo con cada transecto del humedal, con el objetivo de aplicar la misma técnica en un sistema operado bajo condiciones más realistas.

Los valores de actividad heterotrófica de los sistemas escala laboratorio fueron de $23,96 \pm 11,08$, $13,93 \pm 10,45$, $17,41 \pm 6,26$ y $10,36 \pm 1,62$ los cuales correlacionaron muy bien ($R^2 > 0,98$) con la densidad de corriente que generaron las MFC ($9,08E-01 \pm 4,46E-01$, $2,07E-01 \pm 2,08E-01$, $3,56E-01 \pm 4,61E-01$ y $7,33E-04 \pm 1,71E-03$ A/m²_{anodo}). En la segunda parte del trabajo también se obtuvo una muy buena correlación entre los dos parámetros ($R^2 > 0,99$), con una actividad heterotrófica de $13,21 \pm 4,21$, $10,40 \pm 1,90$ y $10,29 \pm 3,34$ y una densidad de corriente de $2,45E-02 \pm 1,11E-03$, $2,15E-02 \pm 8,87E-04$ y $2,12E-02 \pm 7,35E-04$ A/m²_{anodo}, en el primer, segundo y tercer transectos del humedal, respectivamente.

Desde el conocimiento de los autores, este es el primer intento de correlacionar estos dos parámetros, y los resultados han mostrado que la corriente eléctrica generada por una MFC es un parámetro indicador prometedor para la evaluación de la actividad bacteriana general de un humedal construido durante el tratamiento del agua residual.

ABSTRACT

Horizontal subsurface flow constructed wetlands (HSSF CW) have become a well-established alternative to conventional intensive systems for wastewater treatment, especially in developing countries and small communities. Due to the natural redox gradient occurring between the upper layer and the deeper layers, HSSF CW also constitute a suitable environment in which microbial fuel cells (MFC) can be implemented. The combination of both technologies (CW-MFC) could lead to advantages such as a small energy supply, contaminants removal improvement or an on-site monitoring tool in real-time.

The present work attempts to contribute to the latter aspect, with the objective to determine whether the current generated by exoelectrogens from a MFC implemented in a HSSF CW is a good indirect indicator of the wetland's overall heterotrophic activity during domestic wastewater treatment.

To address this objective, the investigation was divided into two main parts. During the first part, four lab-scale systems were batch-fed with real domestic wastewater under different operational conditions, simulating the core of a constructed wetland. The aim of this part was to determine whether the FDA hydrolysis could be a suitable tool to assess the heterotrophic activity and, if so, validate whether current generation of the implemented MFC could be used as an indicator for the heterotrophic activity. During the second part of the project, a pilot scale CW (continuously fed with real domestic wastewater) in which three MFC were implemented in each third of the wetland was used. The main objective of the second part was to apply the same technique in a system operated under more realistic conditions.

The heterotrophic activity values for the lab-scale systems were of 23.96 ± 11.08 , 13.93 ± 10.45 , 17.41 ± 6.26 and 10.36 ± 1.62 , which correlated very well ($R^2 > 0.98$) with current densities generated by the MFCs ($9.08E-01 \pm 4.46E-01$, $2.07E-01 \pm 2.08E-01$, $3.56E-01 \pm 4.61E-01$ and $7.33E-04 \pm 1.71E-03$ A/m²_{anode}). Also, in the second part, using the pilot-scale systems, the correlation between both parameters was very good ($R^2 > 0.99$), with heterotrophic activity values of 13.21 ± 4.21 , 10.40 ± 1.90 and 10.29 ± 3.34 and a current density of $2.45E-02 \pm 1.11E-03$, $2.15E-02 \pm 8.87E-04$ and $2.12E-02 \pm 7.35E-04$ A/m²_{anode}, in the first, second and third third of the wetland, respectively.

To the author's knowledge, this was the first attempt to correlate these two parameters, and the results showed that the current generated with MFCs could be a promising indicator parameter for the assessment of the heterotrophic bacterial activity during wastewater treatment at least in the domain of constructed wetlands.

Contenido

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. ESTADO DEL ARTE	3
3.1. SISTEMAS DE TRATAMIENTO NATURAL DEL AGUA RESIDUAL URBANA.....	3
3.2. HUMEDALES CONSTRUIDOS.....	4
3.2.1. <i>Eliminación de contaminantes en humedales de flujo subsuperficial</i>	7
3.2.2. <i>Humedales de flujo subsuperficial horizontal</i>	9
3.3. PILAS MICROBIANAS.....	11
3.4. COMBINACIÓN DE HUMEDAL CONSTRUIDO Y PILA MICROBIANA....	13
3.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
4.1. ADAPTACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA	17
4.1.1. <i>Información general</i>	17
4.1.2. <i>Diseño y descripción de los sistemas</i>	17
4.1.3. <i>Condiciones operacionales</i>	20
4.1.4. <i>Métodos analíticos</i>	20
4.1.5. <i>Test de actividad mediante la hidrólisis de FDA</i>	22
4.2. APLICACIÓN EN HUMEDALES CONSTRUIDOS ESCALA PILOTO	25
4.2.1. <i>Información general</i>	25
4.2.2. <i>Diseño y descripción de los sistemas</i>	25
4.2.3. <i>Condiciones operacionales</i>	27
4.2.4. <i>Muestreo y métodos analíticos</i>	27
4.2.5. <i>Test de actividad mediante la hidrólisis de FDA</i>	27
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
5.1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA	29

5.1.1.	<i>Caracterización de los sistemas</i>	29
5.1.2.	<i>Validación de la hidrólisis del FDA como método de contraste</i>	30
5.2.	APLICACIÓN DE LA TÉCNICA	32
5.2.1.	<i>Observaciones generales</i>	32
5.2.2.	<i>Caracterización del sistema</i>	33
5.2.3.	<i>Aplicación de la hidrólisis del FDA como método de contraste</i>	33
6.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO	38
	REFERENCIAS	39
	AGRADECIMIENTOS	45

Índice de Figuras

Figura 1. Principales tipos de humedal construido. Extraído de Kadlec and Wallace, 2009.....	4
Figura 2. Esquema de los tipos de humedal más comúnmente usados. (A) Humedal de flujo superficial; (B) Humedal de flujo vertical; (C) Humedal de flujo subsuperficial horizontal. Extraído de Kadlec and Wallace, 2009.....	6
Figura 3. Esquema simplificado de los procesos que ocurren en la degradación de la materia orgánica.....	8
Figura 4. Esquema de una MFC típica. En la oxidación de la materia orgánica (glucosa en la imagen) se liberan electrones al ánodo y protones al medio, lo que resulta en un potencial negativo en el ánodo. Los electrones, entonces, viajan hacia el cátodo gracias a la fuerza electromotriz y los protones a la cámara catódica por difusión. Ahí es donde se produce la reacción de reducción del oxígeno gracias a la presencia de los electrones y protones provenientes de la oxidación. Extraído de Logan et al., 2006.	12
Figura 5. Diacetato de fluoresceína.....	15
Figura 6. A: Esquema de los sistemas de escala piloto. B: Vista lateral (izquierda) de uno de los sistemas escala piloto donde se pueden observar los dos ánodos de grava granítica envueltos de malla de acero inoxidable, la bomba de recirculación y parte del circuito externo. C: Vista en planta del cátodo donde se pueden observar los cuatro trozos de fieltro de carbono y los cables de acero inoxidable que los unen entre ellos y al circuito externo.	18
Figura 7. Esquema de la configuración de los sistemas. Sistemas A: ánodos con biomasa al inicio del período experimental; Sistemas B: ánodos limpios; Sistemas 1: se alimentan de agua residual fresca; Sistemas 2: se alimentan de agua residual proveniente de los sistemas 1...	19
Figura 8. Detalle del análisis de sólidos volátiles. De izquierda a derecha y superior a inferior se puede observar la grava de la cámara anódica al final del período experimental, el volumen de agua a filtrar en el que se ha lavado la grava y los filtros húmedo y después del horno de mufla.	22
Figura 9. Vista en planta (superior) y perfil (inferior) del esquema del humedal construido escala piloto y sus componentes. A: bomba peristáltica; B: influente; C: ánodo; D: cátodo; E/F: cableado hacia el datalogger del cátodo y el ánodo, respectivamente; G: barrera de separación de la zona de entrada del humedal; H: tubos para los muestraeadores de grava; I: tubos para el muestreo del agua intersticial; J: nivel de agua; K: tubo del efluente; L: drenaje del sistema; M: tubo colector del efluente.....	26

Figura 10. Esquema de los tres muestreadores extraíbles de cada transecto del humedal en el interior del reactor en el que se realizaron los test.....	28
Figura 11. Gráfica de la correlación entre la actividad heterotrófica general del sistema y su actividad eléctrica.	32
Figura 12. Correlación entre la actividad eléctrica y la actividad heterotrófica del sistema.....	35
Figura 13. Factores de correlación entre la utilización del FDA y la corriente eléctrica obtenida en las semanas previas al test de actividad.	36

Índice de Tablas

Tabla 1. Vías de degradación según el potencial redox. Adaptado de Faulwetter et al., 2009. .	10
Tabla 2. Influyente y efluente de cada sistema en relación a la Figura 7.....	21
Tabla 3. Carga orgánica y eliminación de DQO	29
Tabla 4. Cantidad de sólidos volátiles en cada sistema.....	30
Tabla 5. Resultados de los test de actividad heterotrófica general de cada sistema.....	31
Tabla 6. Densidad de corriente eléctrica promedio producida por cada sistema.....	31
Tabla 7. Carga orgánica (g DQO/m ² ·d) que ha recibido cada transecto del humedal.....	33
Tabla 8. DQO eliminada (g DQO eliminada/m ² ·d) en cada transecto del humedal.....	33
Tabla 9. Resultados obtenidos de los test de actividad.	34
Tabla 10. Densidad de corriente eléctrica (en A/m ²) registrada la semana previa a cada test de actividad.....	35

Abreviaciones

DBO₅	Demanda biológica de oxígeno a los 5 días
DQO	Demanda química de oxígeno
CW	<i>Constructed wetland</i> (humedal construido)
EX	Exoelectrógenos
FDA	<i>Fluorescein diacetate</i> (diacetato de fluoresceína)
FL	Fluoresceína
FWS	<i>Free water surface</i> (flujo superficial)
HRT	<i>Hydraulic retention time</i> (tiempo de retención hidráulico)
HSSF	<i>Horizontal subsurface flow</i> (flujo subsuperficial horizontal)
MES	Materia en suspensión
MFC	<i>Microbial fuel cell</i> (Pila microbiana)
OLR	<i>Organic loading rate</i> (carga orgánica)
PE	Persona equivalente
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
VF	<i>Vertical flow</i> (flujo vertical)

1. INTRODUCCIÓN

En 2015 la población mundial alcanzó los 7300 millones de personas y se prevé que este número aumente en más de 1000 millones de personas en los próximos 15 años, por lo que se espera una población de 8500 millones de personas en 2030 y de 9700 millones en 2050. Entre las causas del aumento de población en las últimas décadas están los grandes avances en medicina y tecnología. Esto ha llevado a una mejora en la producción y la reducción de la tasa de mortalidad.

El aumento de población ha hecho emerger uno de los problemas más graves que afronta la sociedad actual, la escasez de recursos y, entre ellos, la de agua y energía. De hecho, la escasez de agua ya afecta al 40% de la población humana según la Organización Mundial de la Salud (OMS). El agua es un bien imprescindible para el desarrollo socioeconómico y la producción de alimentos, además de estar estrechamente relacionado con el sistema energético y climático. Uno de los mayores objetivos medioambientales de hoy en día es, no solo evitar que nuestro entorno se deteriore, sino también mantenerlo, protegerlo y mejorarlo y para ello son necesarias estrategias de gestión integrada y sostenibles de los recursos hídricos.

Es en este contexto donde se enmarcan los humedales construidos como método alternativo a las tecnologías convencionales en el saneamiento de las aguas residuales, especialmente en pequeñas poblaciones. Entre las ventajas de estos sistemas se encuentra su bajo o nulo requerimiento energético o de reactivos ya que la depuración del agua se produce de manera natural, la posibilidad de usar materiales y mano de obra de la región y su fácil mantenimiento y operación. Aunque una de sus mayores desventajas es el relativamente elevado requerimiento de superficie, comparado con las tecnologías convencionales.

Desde hace unos años, se ha empezado a investigar la implementación de pilas microbianas en los humedales de flujo subsuperficial horizontal ya que las pilas pueden aprovechar al gradiente redox natural que ocurre entre las capas superficiales del humedal y las más profundas. La combinación de ambas tecnologías no solo podría representar una fuente de energía para el tratamiento, sino que también podría mejorar su eficiencia y el monitoreo del mismo tratamiento.

Un parámetro clave para la determinación del grado de eficiencia del tratamiento biológico de las aguas residuales es la actividad bacteriana. Actualmente la mayoría de las técnicas que se usa para su medida, son complejas, costosas y no se pueden aplicar en continuo. En este trabajo se pretende explorar si la corriente eléctrica generada durante el tratamiento del agua residual por los organismos exoelectrogénicos de la pila microbiana integrada en un humedal puede ser usada como parámetro indirecto indicador de la actividad bacteriana general de éste. Desde el conocimiento de los autores, este es el primer intento de evaluar la correlación entre estos dos parámetros.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del siguiente trabajo es determinar si la corriente eléctrica que produce una pila microbiana instalada en un humedal construido puede ser indicadora de la actividad microbiana heterotrófica general de dicho humedal durante el tratamiento del agua residual.

Para ello se plantean diferentes objetivos específicos:

1. Adaptar y poner a punto la técnica que se utilizará para medir la actividad microbiana (la hidrólisis del diacetato de fluoresceína, FDA)
2. Validar ésta técnica como contraste a la actividad eléctrica en humedales construidos combinados con pilas microbianas (CW-MFC, *constructed wetlands microbial fuel cells*) de escala laboratorio
3. Aplicar la técnica en CW-MFC de escala piloto

Puesto que no se ha encontrado en la literatura ningún trabajo de características similares, mediante estos objetivos se pretende estudiar una nueva aplicación de las pilas microbianas.

3. ESTADO DEL ARTE

3.1. SISTEMAS DE TRATAMIENTO NATURAL DEL AGUA RESIDUAL URBANA

Los sistemas de tratamiento naturales, también llamados tecnologías no convencionales, sistemas de bajo coste o sistemas verdes, entre otros, son todos aquellos sistemas que llevan a cabo la eliminación de los contaminantes de las aguas residuales mediante mecanismos y procesos naturales, sin la adición de energía externa ni reactivos químicos, sino gracias a diferentes comunidades de organismos (García and Corzo, 2008).

Las principales diferencias de estos sistemas respecto de los convencionales es un consumo de energía nulo durante el tratamiento del agua residual, pero un requerimiento mayor de superficie.

Los sistemas naturales se pueden clasificar en dos categorías según si el tratamiento se lleva a cabo en el terreno o bien en una masa de agua:

- Tratamientos basados en la aplicación del agua residual en el terreno:
 - Aplicación subsuperficial:
 - Zanjas y lechos filtrantes
 - Humedales construidos de flujo subsuperficial
 - Aplicación superficial
 - Filtros verdes
 - Infiltración – Percolación
 - Filtros de arena
- Tratamientos basados en procesos que se producen en la masa de agua:
 - Sistemas con plantas flotantes
 - Lagunaje natural
 - Humedales construidos de flujo superficial

En el siguiente apartado se tratarán de forma más detallada los humedales construidos, ya que es en esta tecnología de tratamiento en la que se centra el trabajo.

3.2. HUMEDALES CONSTRUIDOS

Los humedales contruidos (CW, *constructed wetlands*) son sistemas que, mediante procesos físicos, químicos y biológicos que se producen de forma natural permiten el tratamiento de agua residual tanto urbana como industrial y agrícola en diferentes zonas climáticas (Molle *et al.*, 2005; García *et al.*, 2010; Vymazal, 2011).

En un CW el agua fluye a través del lecho de tratamiento, el cual consiste en una cuenca recubierta de material aislante y rellena de un material filtrante (normalmente grava o arena) habitualmente plantada con plantas acuáticas, como macrófitos.

Los principales tipos de humedales contruidos se diferencian y caracterizan en función de los siguientes parámetros de diseño (Kadlec and Wallace, 2009):

- Hidrología: superficial o subsuperficial
- Crecimiento de macrófitos: emergentes, flotantes o sumergidos
- Vía de flujo de agua: vertical o horizontal

En la siguiente figura (Figura 1) se puede observar la clasificación de los humedales en función de los parámetros anteriores.

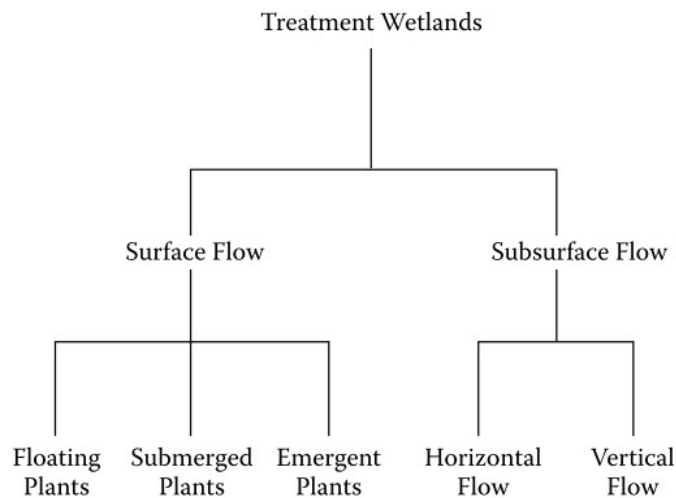


Figura 1. Principales tipos de humedal construido. Extraído de Kadlec and Wallace, 2009.

Según el flujo del agua, se pueden diferenciar los tres tipos de humedal más ampliamente usados (Figura 2) (Vymazal, 2007; Kadlec and Wallace, 2009):

- Humedales de flujo superficial (FWS, *Free Water Surface*), en los que el agua circula libremente por encima del sustrato y en contacto con la atmosfera y contiene macrófitos (flotantes, submergidos y emergentes). Se asemejan mucho a las marismas y humedales naturales. Normalmente se usan como tratamiento avanzado posterior a un tratamiento secundario e incluso terciario, como por ejemplo lagunas, filtros percoladores o sistemas de fangos activados, aunque también para el tratamiento de las aguas de episodios de tormenta, las aguas de drenaje de minas y el tratamiento de lixiviados.
- Humedales de flujo subsuperficial vertical (VF, *Vertical Flow*), en los que el agua fluye a través del lecho de forma vertical. Habitualmente se emplean cargas de agua en pulso que inunda la parte superficial del sistema y va percolando hacia la parte inferior. Los VF CW son anaerobios debido a que la lámina de agua está por debajo de la altura del material granular, pero típicamente se favorece un ambiente aerobio mediante tubos con el objetivo de incrementar la actividad nitrificadora. Es por esta razón que suelen usarse para el tratamiento de aguas con una carga de amonio elevada como podrían ser los lixiviados de la actividad agrícola o las aguas residuales de la industria alimentaria. Los VF-CW también son capaces de tratar aguas residuales muy concentradas.
- Humedales de flujo subsuperficial horizontal (HSSF, *Horizontal Subsurface Flow*), en los que el agua fluye por debajo de la superficie del lecho de grava de forma horizontal desde la zona del influente hasta la del efluente. Este tipo de humedal es en el que se centra el trabajo desarrollado, es por ello que se describe con más detalle en el siguiente apartado.

Para incrementar la eficiencia del tratamiento del agua residual, se suelen combinar varios tipos de humedal, así se pueden aprovechar las ventajas de cada uno de ellos. Una combinación común para incrementar la eliminación del nitrógeno es la de VF CW, donde se lleva a cabo la nitrificación, seguido de HSSF CW, donde ocurre la desnitrificación (Vymazal, 2011).

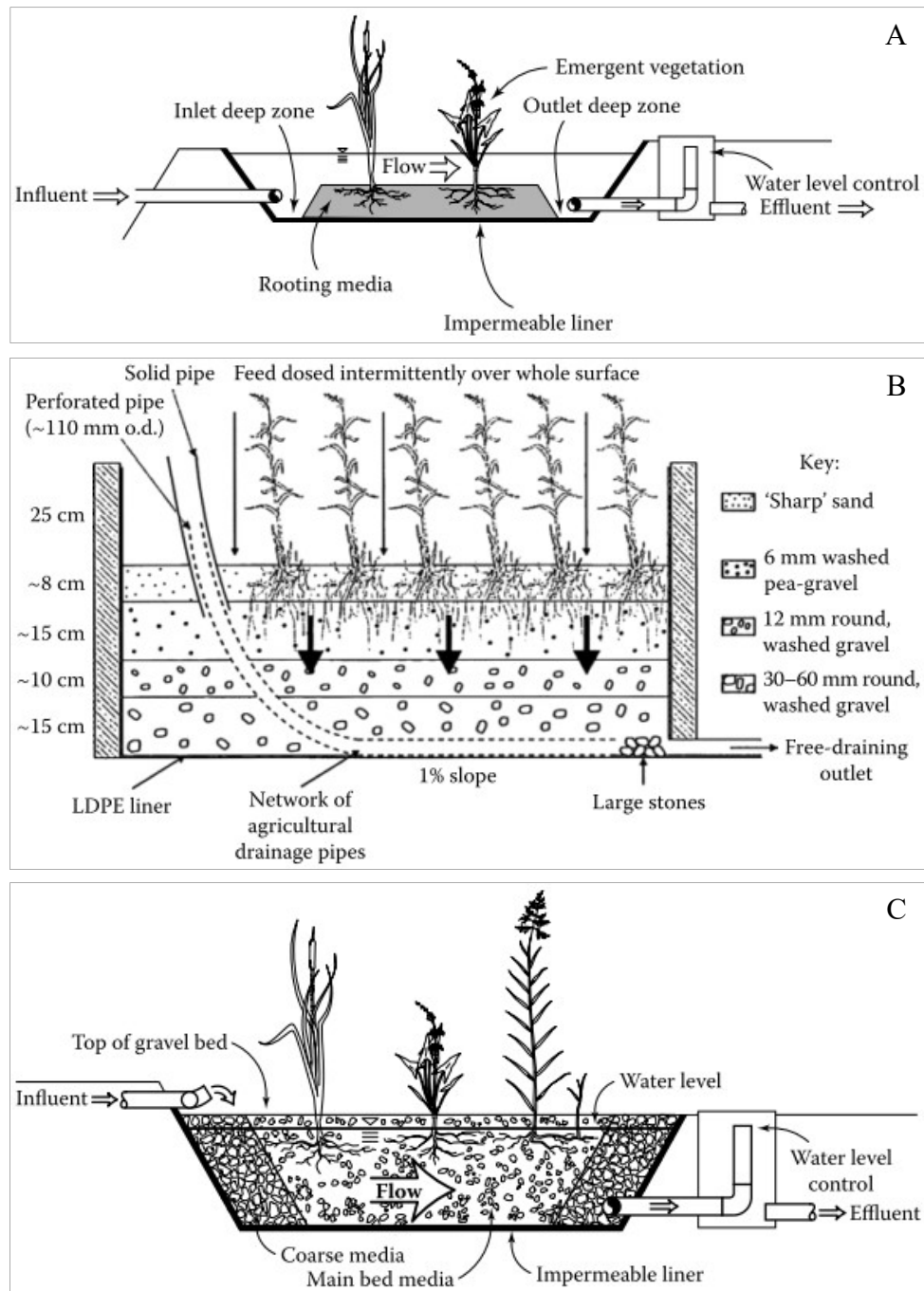


Figura 2. Esquema de los tipos de humedal más comúnmente usados. (A) Humedal de flujo superficial; (B) Humedal de flujo vertical; (C) Humedal de flujo subsuperficial horizontal. Extraído de Kadlec and Wallace, 2009.

Las principales diferencias entre los sistemas de flujo subsuperficial y los de flujo superficial son que los primeros admiten una mayor carga orgánica (y, por tanto, tienen mayor capacidad de tratamiento), que el riesgo de contacto del agua con las personas y la aparición de insectos es

menor y tienen poca utilidad en proyectos de restauración debido a que el agua no está accesible (Garcia and Corzo, 2008).

Las ventajas que ofrecen los humedales construidos respecto a un sistema de tratamiento convencional es su baja demanda energética, un mantenimiento y operación sencillos y la posibilidad de usar materiales y mano de obra de la región. Por estos motivos, los humedales construidos son una gran alternativa a los sistemas convencionales para el tratamiento del agua residual, especialmente en áreas rurales y pequeñas comunidades (<2000 habitantes equivalentes) o en países en vías de desarrollo (Puigagut *et al.*, 2007; Garcia and Corzo, 2008; Kadlec and Wallace, 2009). Entre sus desventajas se encuentra principalmente la demanda superficial relativamente elevada comparada con los tratamientos intensivos, cuantificada por Kadlec & Wallace (2009) en 1 a 20 m²/PE.

3.2.1. Eliminación de contaminantes en humedales de flujo subsuperficial

Además de la materia en suspensión y la materia orgánica, otros contaminantes relevantes que deben eliminarse en el tratamiento del agua residual son el nitrógeno, el fósforo o los patógenos.

- La materia en suspensión (MES) queda retenida en los humedales debido a diferentes procedimientos físicos de filtración, entre ellos la sedimentación y el tamizado. En los humedales de flujo horizontal, estos procesos suceden en la zona de entrada mayoritariamente (en el primer cuarto o tercio del humedal), mientras que en los humedales verticales esto ocurre en los primeros centímetros de grava.

La eliminación de la materia en suspensión está alrededor del 90%.

- La materia orgánica, en cambio, se elimina por una combinación de procesos físicos, químicos y biológicos. La materia orgánica particulada, queda retenida por filtración igual que la MES, pero se va fragmentando, hidrolizando y asimilando por diferentes mecanismos (ver Figura 3). Las vías de degradación de la materia orgánica en humedales incluyen tanto procesos aeróbicos, como fermentativos o anóxicos (como la desnitrificación).

El rendimiento de eliminación de la materia orgánica puede variar entre el 75 y el 95%.

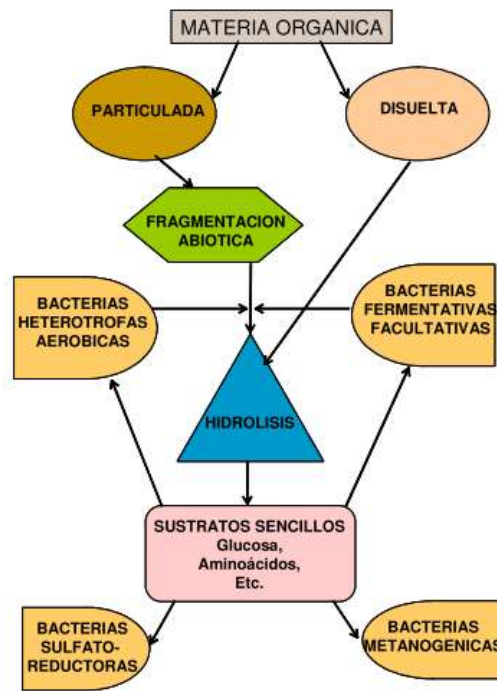


Figura 3. Esquema simplificado de los procesos que ocurren en la degradación de la materia orgánica.

- Nutrientes:
 - Nitrógeno: en el agua residual urbana, el nitrógeno se encuentra principalmente en forma de amonio y se elimina mayoritariamente por la degradación microbiana mediante procesos de nitrificación – desnitrificación. Ya que la nitrificación es un proceso aeróbico, funciona muy bien en humedales verticales, pero no en horizontales. Por esta razón una combinación de humedales común VF seguidos de HSSF, en los primeros tiene lugar la nitrificación (conversión de amonio a nitrato) y en los segundos la desnitrificación (nitrato a nitrógeno gas). Otro procedimiento para la eliminación del nitrógeno en los humedales (entre el 10% y el 20%) es la asimilación por las plantas del amonio o nitrato.
 - Fósforo: en general no suele eliminarse más del 10 o el 20% de fósforo en los humedales (tanto VF como HSSF). Los mecanismos para su eliminación pueden ser bióticos (asimilación por plantas y microorganismos) y abióticos (adsorción en el medio granular).
- La eliminación de microorganismos fecales es un proceso complicado que depende de factores como la filtración, la adsorción y la depredación por otros organismos. En los humedales subsuperficiales la eliminación de microorganismos depende del tiempo de permanencia y del medio granular (a menor diámetro, mayor eliminación).

Por último, cada vez más se monitorea los contaminantes emergentes en la depuración de las aguas, como los tensioactivos, los metales pesados, productos farmacéuticos, productos de uso personal y limpieza y algunos microorganismos (como *Cryptosporidium*).

3.2.2. Humedales de flujo subsuperficial horizontal

La configuración más ampliamente usada es la de los humedales de flujo subsuperficial horizontal. En estos, el agua fluye horizontalmente y por debajo de la superficie del medio granular. Los HSSF CW se operan bajo condiciones de saturación y con una profundidad de agua de entre 0,3 y 0,6 m. Debido a esto, los humedales de flujo subsuperficial horizontal son mayormente anaerobios, lo cual provoca un requerimiento de superficie elevado comparado con las tecnologías convencionales intensivas. Ya que esta es su principal desventaja, la investigación en este campo se ha centrado en los últimos años en la mejora del tratamiento para reducir esta necesidad. Entre las estrategias seguidas para incrementar el rendimiento de los humedales se encuentra la de incluir aireación, lo cual produce una mejora en la eliminación de materia orgánica y la reducción de las especies de nitrógeno, pero, al mismo tiempo, encarece el tratamiento debido al incremento en la demanda energética.

La ratio de eliminación de la mayoría de contaminantes en los humedales está afectada por diferentes parámetros de diseño tales como la proporción entre longitud y amplitud del sistema, el tamaño del medio granular, la profundidad de agua o la tasa de carga orgánica (OLR, *organic loading rate*) (García *et al.*, 2003), siendo este último el principal criterio de diseño de un HSSF y establecido un valor de 6 g DBO₅/m²·d para poder generar un efluente con menos de 30 mg/L DBO₅. Kadlec and Wallace (2009) definieron una superficie promedio de 5 m² por persona equivalente (PE) necesaria para tratar agua residual después de un tratamiento primario de sedimentación.

Como se ha comentado anteriormente, el principal propósito del tratamiento del agua residual es la eliminación de la materia orgánica, aunque también la de otros compuestos inorgánicos como el fósforo o el nitrógeno. De hecho, durante el tratamiento del agua residual, la materia orgánica se puede degradar mediante procesos de respiración aeróbica, desnitrificación, reducción de sulfatos, fermentación o metanogénesis de forma que el nitrógeno, el fósforo o el azufre, se eliminan al mismo tiempo que la materia orgánica.

La eliminación de los contaminantes depende mucho de las condiciones redox del entorno, es decir, de qué aceptores terminales de electrones estén disponibles (Faulwetter *et al.*, 2009; García *et al.*, 2010). En el metabolismo bacteriano no sólo es importante qué fuente de carbono esté disponible, sino la energía que se adquiere en el proceso. La cantidad de energía depende tanto

del donador como del aceptor de electrones. Así, si el ambiente es aerobio, la vía predominante de degradación será la de la respiración aeróbica, ya que el oxígeno es el aceptor de electrones más eficiente; mientras que si el ambiente es anaeróbico o anóxico, se usaran otros aceptores de electrones como el nitrato o el sulfato (Kadlec and Wallace, 2009). En la Tabla 1 se pueden observar diferentes vías de degradación en función del potencial redox (Faulwetter *et al.*, 2009).

Tabla 1. Vías de degradación según el potencial redox. Adaptado de Faulwetter *et al.*, 2009.

Proceso	Aceptor de electrones	Producto final	Potencial redox (mV)
Respiración aerobia	O ₂	H ₂ O	300 a 700
Reducción de nitrato	NO ₃ ⁻	N ₂ , NO _x	100 a 350
Reducción de manganeso	Mn ₄ ⁺	Mn ₂ ⁺	-100 a 300
Reducción de hierro	Fe ₃ ⁺	Fe ₂ ⁺	-100 a 200
Reducción de sulfato	SO ₄ ²⁻	S ₂ ⁻	-200 a -100
Metanogénesis	CO ₂	CH ₄ , CO ₂	-350 a -100

En lo que se refiere a la degradación de materia orgánica en los HSSF, ésta se lleva a cabo en diferentes pasos y por una comunidad bacteriana muy diversa e interconectada (Kadlec and Wallace, 2009). Aunque en los humedales construidos la comunidad bacteriana sea relativamente estable a lo largo del tiempo, al menos una vez establecida, su actividad sí que puede verse afectada por condiciones fisicoquímicas y factores biológicos como, por ejemplo, el tipo de material filtrante, las condiciones hidráulicas, la presencia o no de plantas o la temperatura (Nguyen, 2000; Baptista *et al.*, 2003; Truu, Juhanson and Truu, 2009).

Por otro lado, el nitrógeno inorgánico se elimina mediante la captación por las plantas y procesos de nitrificación – desnitrificación (García *et al.*, 2010), aunque debido a la naturaleza mayoritariamente anaeróbica de los HSSF, los procesos de nitrificación (que requieren de oxígeno para la transformación del amonio a nitrato) se ven limitados. Aun así, varios autores han observado tasas eliminación de nitrógeno total de 40-50% (Vymazal, 2007), 33-68% (Puigagut *et al.*, 2007) e incluso de más del 80% en humedales poco profundos (Caselles-Osorio and García, 2007).

3.3. PILAS MICROBIANAS

Una pila microbiana (MFC, *Microbial Fuel Cell*) es un sistema bio-electroquímico en el que se combinan procesos biológicos y electroquímicos para generar una corriente eléctrica mediante un tipo de microorganismos llamados exoelectrogénicos, los cuales actúan de catalizador (Logan *et al.*, 2006).

Las bacterias exoelectrogénicas (EX) deben su nombre a la capacidad de transferir los electrones que obtienen con la oxidación la materia orgánica a un aceptor de electrones insoluble situado fuera de la propia célula, por ejemplo, a un electrodo de la pila. Para que esto suceda, es necesario que el electrodo sea el aceptor de electrones preferencial, es decir, que tenga el potencial redox más elevado que los otros sustratos susceptibles de aceptar electrones. Estas condiciones se producen manteniendo un ambiente anaerobio en la cámara dónde ocurren las reacciones de oxidación, la cámara anódica. Generalmente se usan membranas de intercambio iónico para evitar que el oxígeno alcance la cámara anódica, separando las dos cámaras de la pila. Aun así, existen MFC sin membrana en las que se genera o aprovecha el gradiente redox natural que se produce entre los dos electrodos, como ocurre, por ejemplo, en arrozales, sedimentos marinos y humedales construidos (Bond *et al.*, 2002; Kaku *et al.*, 2008).

Se conoce una gran diversidad de microorganismos pertenecientes a varios grupos filogenéticos, que son capaces de respirar en un ánodo y, además, también se ha visto que las pilas compuestas por cultivos mixtos de microorganismos generalmente generan una densidad de corriente más elevada que aquellas en las que crecen cultivos puros (Rabaey and Verstraete, 2005; Nevin *et al.*, 2008). Esto refuerza la idea de que el incremento en la electricidad generada puede ser debido a una interacción sinérgica entre la comunidad microbiana.

Así pues, en una MFC las bacterias EX oxidan diferentes sustratos, principalmente carbohidratos simples como la glucosa o el acetato que están presentes en el medio debido a la oxidación de otros sustratos orgánicos más complejos (como el agua residual) (Reimers *et al.*, 2001; Min and Logan, 2004), transfiriendo los electrones al ánodo de la pila. Desde aquí, fluyen a través de un material conductor y una resistencia hasta un aceptor terminal de electrones (generalmente el oxígeno), situado en otro compartimento, el cátodo. Es decir, el sistema se basa en una reacción de oxidación – reducción (redox) separada en dos compartimentos diferentes. En la Figura 4 se puede observar el esquema de una MFC típica.

A modo de ejemplo, la reacción redox de la glucosa que podría darse en una pila microbiana es la siguiente:

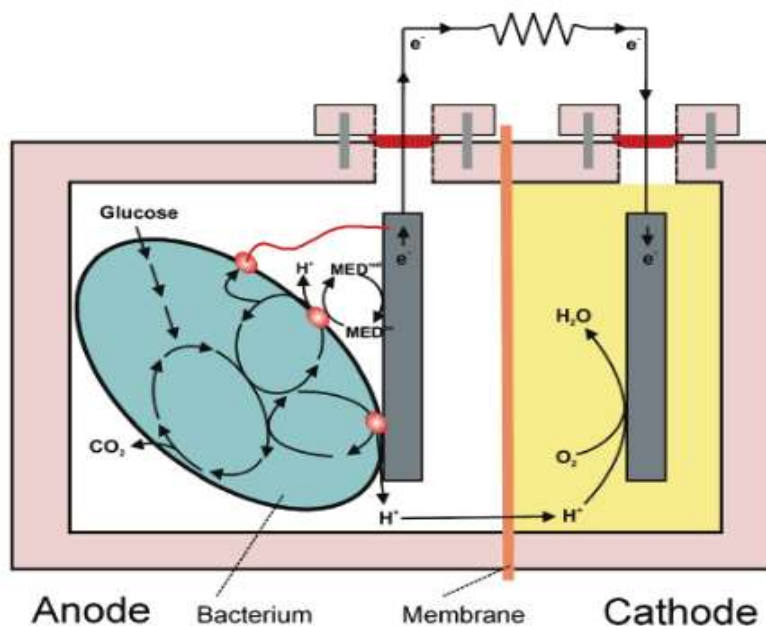
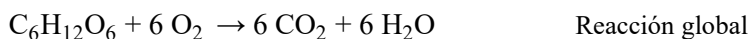


Figura 4. Esquema de una MFC típica. En la oxidación de la materia orgánica (glucosa en la imagen) se liberan electrones al ánodo y protones al medio, lo que resulta en un potencial negativo en el ánodo. Los electrones, entonces, viajan hacia el cátodo gracias a la fuerza electromotriz y los protones a la cámara catódica por difusión. Ahí es donde se produce la reacción de reducción del oxígeno gracias a la presencia de los electrones y protones provenientes de la oxidación. Extraído de Logan et al., 2006.

El funcionamiento de una MFC está sujeto a varios factores biológicos, químicos y eléctricos como la ratio de conversión de sustrato, los sobrepotenciales tanto en el ánodo como en el cátodo, factores relacionados con la membrana de intercambio de protones o la resistencia interna de la misma pila (Rabaey and Verstraete, 2005), pero, además, también tienen impacto varios parámetros operacionales como la concentración de materia orgánica en la cámara anódica, la temperatura, el pH y las características del ánodo y del cátodo (su área superficial, los materiales o la distancia relativa entre ambos electrodos) (Jadhav and Ghangrekar, 2009).

Es por esto por lo que, aunque la fuerza electromotriz (E_{emf}) de la pila depende del potencial del ánodo (E_{an}) y, por lo tanto, del gradiente redox entre el ánodo y el cátodo (ver Ec.1) (Logan *et al.*, 2006; Rabaey *et al.*, 2007), el voltaje que se mide en una pila es la fuerza electromotriz menos los sobrepotenciales tanto del ánodo (η_a) como del cátodo (η_c) y las pérdidas óhmicas del sistema (ver Ec.2) (Logan *et al.*, 2006).

$$E_{emf} = E_{cat} - E_{an} \quad [Ec.1]$$

$$E_{cell} = E_{emf} - (\Sigma \eta_a + |\Sigma \eta_c| + IR_{\Omega}) \quad [Ec.2]$$

3.4. COMBINACIÓN DE HUMEDAL CONSTRUIDO Y PILA MICROBIANA

La primera referencia a la incorporación de una pila microbiana en un humedal construido (CW-MFC, *constructed wetland microbial fuel cell*) surgió en el año 2012 (Yadav *et al.*, 2012) y, desde entonces, el interés en la combinación de estas dos tecnologías no ha dejado de aumentar. En su mayoría, las publicaciones existentes se focalizan en mejorar la eficiencia del tratamiento del agua residual y/o en la generación de energía investigando diferentes diseños y condiciones operacionales de los humedales, aunque se trata de sistemas que no se ajustan al que sería su funcionamiento real. De hecho, la mayoría de sistemas investigados están diseñados a escala laboratorio, de forma que las condiciones hidráulicas son muy diferentes, y el agua residual utilizada es sintética y el único estudio hasta la fecha en el que emplean humedales a escala piloto también fue alimentado con agua sintética (Villaseñor *et al.*, 2013).

Aun con estas limitaciones, se ha demostrado una mejora en la eficiencia del tratamiento del agua residual en los CW-MFC comparativamente a los CW convencionales y los CW-MFC con el circuito eléctrico abierto. Concretamente, diferentes autores han observado una mejora en la eficiencia de eliminación de la DQO (demanda química de oxígeno, ver apartado 4.1.4.1) entre CW-MFC y CW desde el 44,5±3,3% (Wang *et al.*, 2016) hasta el 100% (Oon *et al.*, 2015). También los estudios realizados por Katuri *et al.* (2011) muestran un incremento en la eliminación de la DQO de entre el 16% y el 20% comparando MFC y MFC de circuito abierto, igual a los resultados de Srivastava *et al.* (2015), que también obtiene un incremento del 10-30% en comparar CW-MFC y CW convencional. No solo en la eliminación de la DQO se han demostrado mejoras con la implementación de pilas en los humedales, sino que también se han observado para otros parámetros como el amonio (Jung *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009). De hecho, Corbella y Puigagut (2018) han cuantificado una eliminación de amonio del 66±14% y 53±17% en MFCs de circuito cerrado y abierto.

En cuanto a la generación de energía se ha visto que las MFC convencionales pueden llegar a producir una potencia de hasta $12 \text{ W} \cdot \text{m}^{-3}$ (Logan and Rabaey, 2012), aunque, en combinación con un humedal, el máximo alcanzado son $2 \text{ W} \cdot \text{m}^{-3}$ (Xu *et al.*, 2017) y el promedio en la mayoría de sistemas aun un orden de magnitud más bajo, concretamente en sistemas que usan agua residual de $9,4 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-2}$ y $276 \text{ mW} \cdot \text{m}^{-3}$, según Zhao *et al.* (2013) y Doherty *et al.* (2015), respectivamente.

Por último, otro campo en el que han empezado a explorarse los sistemas bioelectroquímicos y con el cual está relacionado el principal objetivo del trabajo es la bioindicación. Puesto que los BES generan una corriente eléctrica a partir de la oxidación de la materia orgánica presente en el agua, estos dos parámetros teóricamente deberían estar relacionados proporcionalmente. Así, se podría utilizar la pila del humedal para monitorizar a tiempo real la calidad del agua, correlacionando la corriente generada con diferentes parámetros relacionados con el tratamiento del agua (Peixoto *et al.*, 2011). De hecho, en MFC convencionales, varios autores han observado una correlación lineal de $R^2 > 0,9$ entre la cantidad de materia orgánica presente en el compartimento del ánodo y la señal eléctrica que se produce (Kim *et al.*, 2003; Di Lorenzo *et al.*, 2009; Peixoto *et al.*, 2011; Gonzalez del Campo *et al.*, 2013) y en CW-MFC, aunque la bioindicación no fuera objeto de estudio, también se ha observado una correlación entre la concentración de materia orgánica del influente del sistema y la electricidad generada por la MFC (Liu *et al.*, 2014; Srivastava, Yadav and Mishra, 2015). En comparación con otras técnicas de evaluación de la calidad del agua tratada como la DQO, la DBO_5 o el TOC (carbono orgánico total), el uso de MFC como indicador indirecto supone una ventaja ya que permite el monitoreo de forma on-line, in-situ y a tiempo real, sin necesidad de toma de muestras ni consumo de reactivos o tiempo de ensayo.

3.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROBIANA

El diacetato de fluoresceína (3',6'-diacetylfluorescein, FDA) (Figura 5) es un compuesto no polar de fluoresceína conjugada a dos radicales acetato. Estos radicales pueden ser hidrolizados por diferentes tipos de enzimas tanto intracelulares como extracelulares como las proteasas, lipasas o esterasas, liberando la fluoresceína (Schnurer and Rosswall, 1982; Adam and Duncan, 2001). La fluoresceína es un compuesto que absorbe fuertemente en la longitud de onda visible, concretamente a 490 nm, de forma que puede medirse su presencia y cantidad con facilidad mediante técnicas espectrofotométricas (Adam and Duncan, 2001).

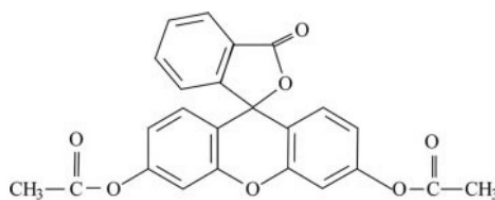


Figura 5. *Diacetato de fluoresceína.*

Diferentes estudios han usado la hidrólisis de FDA para medir la actividad microbiana o la biomasa activa de todo tipo de muestras como suelos, meso-cosmos de humedales, fangos activados, biofilms de sedimentos de corrientes naturales, etc. (Fontvieille, Outaguerouine and Thevenot, 1992; Battin, 1997; Adam and Duncan, 2001; Iasur-Kruh *et al.*, 2010).

Este tipo de ensayo presenta varias ventajas con respecto a otras técnicas habitualmente usadas para la misma finalidad ya que suelen consumir mucho tiempo, son complicadas de realizar o bien requieren de equipos especializados, aunque también presenten sus propias ventajas. Así, por ejemplo, en el análisis del ATP (adenosintrifosfato) la mayor ventaja es que no necesario tiempo de incubación ya que se extrae el contenido de ATP directamente de la célula, aunque se requiere de mucha precisión en la extracción para evitar la degradación del compuesto, además de tener que usar equipos específicos; los test de respirometría, también usados para la cuantificación de la actividad y/o biomasa, permiten obtener medidas cuantitativas directamente, aunque son necesarias muchas horas de incubación y ensayo para obtenerlas (Schnurer and Rosswall, 1982). En cambio, la hidrólisis de FDA tiene las ventajas de ser un método simple, rápido y sensible, además de estar muy aceptado como medida de la actividad microbiana general (Adam and Duncan, 2001).

Aún con estas ventajas, hay algunos factores que afectan al funcionamiento del test y, por lo tanto, deben tenerse en consideración, por ejemplo, el pH, la temperatura, la concentración de FDA que se utilice, el tipo de muestra, el tiempo de incubación o la forma de finalizar la reacción de hidrólisis.

El pH es uno de los factores que más afecta la absorbancia o fluorescencia de la fluoresceína. Varios autores (Guilbault and Kramer, 1964; Adam and Duncan, 2001) han comprobado que un pH de 7,6 es óptimo para realizar este análisis ya que la fluoresceína tiene su máximo de absorbancia muy cerca de este pH y, además, el FDA no se hidroliza espontáneamente, como sí ocurre a pH elevados (Guilbault and Kramer, 1964).

El FDA es un compuesto muy poco soluble en agua así que no se recomienda utilizar concentraciones demasiado altas, ya que el compuesto no estará disponible para los

microorganismos. Adam y Duncan (2001) recomiendan una concentración de fluoresceína final de alrededor de 5-8 μg de fluoresceína/ml.

Otro punto clave es la finalización de la reacción de hidrólisis del FDA, puesto que esta reacción es bastante rápida, si se analizan varias muestras en el mismo ensayo, será necesario detenerlo en un determinado tiempo. Varios estudios han investigado el uso de diferentes reactivos para terminar la reacción de hidrólisis. Schnürer y Rosswall (1982) encontraron que la acetona (50% v/v) conseguía detener la reacción completamente hasta 2 horas después, aunque su adición a la muestra también causa una disminución muy severa en la absorbancia. Por otro lado, Adam y Duncan (2001) compararon el uso de la acetona tal como Schnürer y Rosswall con el uso de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v) y determinaron que éste permite obtener mejores resultados de absorbancia, especialmente en aquellas muestras en las que se espera una actividad muy baja. También se ha investigado otros métodos como el formaldehído, el cloruro de mercurio o el autoclavado (Fontvieille, Outaguerouine and Thevenot, 1992; Battin, 1997).

Finalmente, como toda reacción enzimática, la hidrólisis del diacetato de fluoresceína es dependiente de la temperatura y el tiempo de reacción. Aunque muchos autores comprueban la temperatura y el tiempo de incubación adecuados al tipo de investigación, suelen mantenerse mayores a una hora (normalmente alrededor de 3 h) y a una temperatura de 30°C, donde se encuentra el máximo de actividad enzimática (Adam and Duncan, 2001).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ADAPTACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA

4.1.1. Información general

En la primera parte del trabajo se presentarán los métodos y sistemas utilizados para la puesta a punto de la técnica de la hidrólisis de fluoresceína en las condiciones y finalidad para la que se usará como método de evaluación de la actividad microbiana y, posteriormente, su aplicación en sistemas a escala laboratorio para validarla como técnica de contraste a la producción eléctrica de una MFC.

4.1.2. Diseño y descripción de los sistemas

Los sistemas utilizados en la primera parte del trabajo pretenden simular pilas microbianas implementadas en un humedal construido. Es por ello que se han diseñado cuatro sistemas individuales a escala laboratorio que parten de condiciones iniciales diferentes pretendiendo representar cada uno de ellos una sección del humedal, desde la entrada hasta la salida.

Cada sistema consta de una cámara anódica (un cilindro de metacrilato de 9 cm de diámetro y 15 cm de altura) y de una cámara catódica (cilindro de PVC de 19 cm de diámetro y 5 cm de altura) situada justo encima de la primera y conectadas externamente mediante una resistencia de 220 Ω (Corbella and Puigagut, 2018), tal como se representa en la Figura 6.

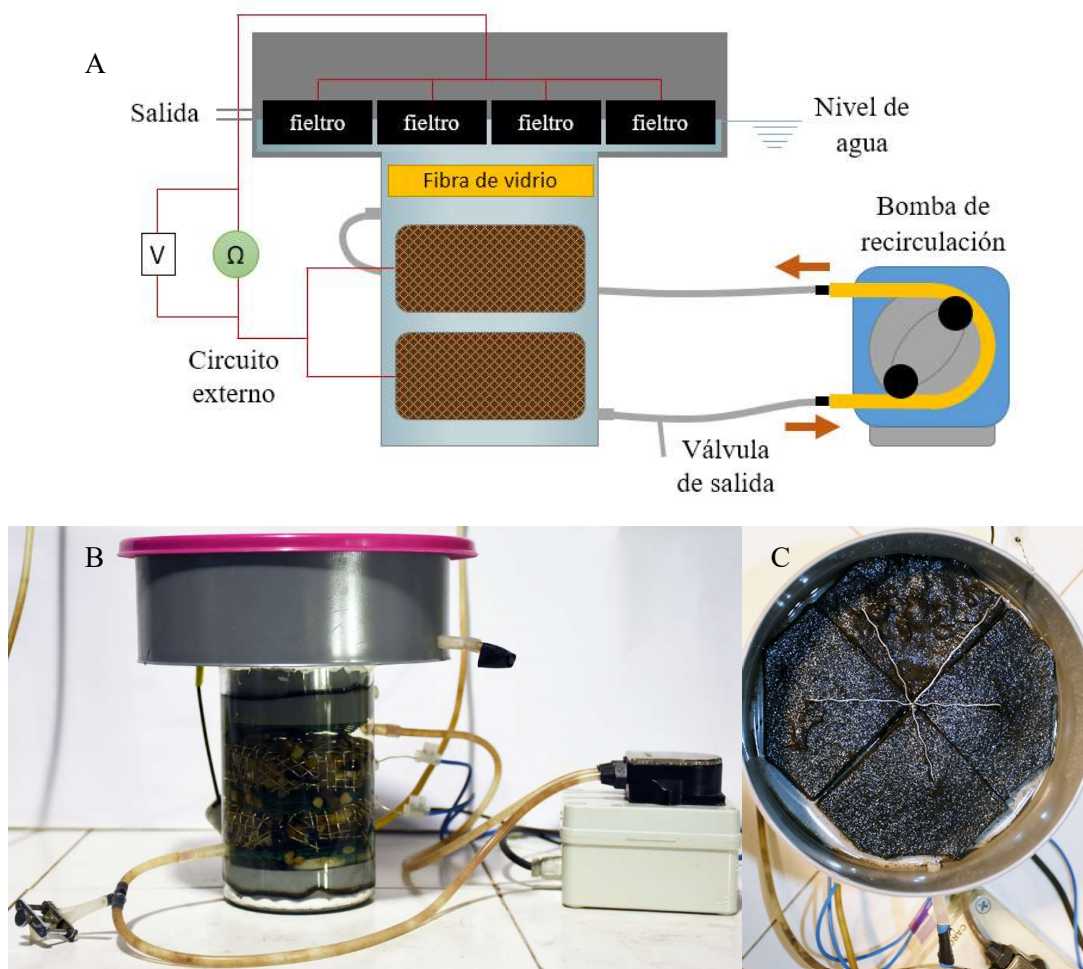


Figura 6. *A: Esquema de los sistemas de escala piloto. B: Vista lateral (izquierda) de uno de los sistemas escala piloto donde se pueden observar los dos ánodos de grava granítica envueltos de malla de acero inoxidable, la bomba de recirculación y parte del circuito externo. C: Vista en planta del cátodo donde se pueden observar los cuatro trozos de fieltro de carbono y los cables de acero inoxidable que los unen entre ellos y al circuito externo.*

En el interior de la cámara anódica se encuentran dos celdas de malla de acero inoxidable (acero inoxidable 316L grado marino) llenas de grava granítica ($D_{60} = 7,3$; $C_u = 0,8$; porosidad = 40%) donde, para asegurar una buena homogeneización, se genera una recirculación continua mediante una bomba peristáltica (caudal de 3,2 L/h). El volumen anódico total es de 0,8 L. A su vez, el cátodo consiste en cuatro piezas de fieltro de carbono (1,27 cm de grosor, 99,0% de pureza de carbono y una superficie proyectada de 60,8 cm² en total) conectadas entre ellas y con el circuito externo mediante cables del mismo acero inoxidable del ánodo. El cátodo se ha mantenido semi-sumergido, de forma que los fieltros estén en contacto con el líquido de la cámara anódica y con el aire al mismo tiempo. Entre las dos cámaras se ha situado una capa de lana de vidrio (Venkata Mohan, Veer Raghavulu and Sarma, 2008) para evitar que el oxígeno pueda filtrarse hacia el

ánodo de la pila. Finalmente, se ha conectado un *datalogger* (CR1000, Campbell Scientific) en paralelo al circuito externo de la pila, el cual registra continuamente el voltaje que genera cada una a través de la resistencia del circuito (ver Figura 6A).

Para poder evaluar si la corriente eléctrica de una pila puede ser usada como bioindicadora de la actividad microbiana general de un humedal construido, es necesario poder evaluar diferencias en ambos parámetros. En este caso, se han creado diferencias en las condiciones experimentales de los sistemas mediante (i) la cantidad de biomasa de la cámara anódica y (ii) la cantidad de materia orgánica que alimenta el sistema. Concretamente, los ánodos de dos de las pilas (llamadas “A”) estaban ya colonizados por biomasa (estos ánodos tenían una antigüedad de un año durante el que fueron alimentados de forma similar a la de este trabajo) mientras que las otras dos (llamadas “B”) contenían ánodos limpios. La alimentación de los sistemas fue de tipo *batch* y de forma consecutiva entre los sistemas. Es decir, el efluente de un sistema (sistema “1”) se ha usado como influente del siguiente (sistema “2”). Así, encontramos cuatro sistemas: A1, A2, B1 y B2. En la Figura 7 puede observarse un esquema de la configuración descrita.

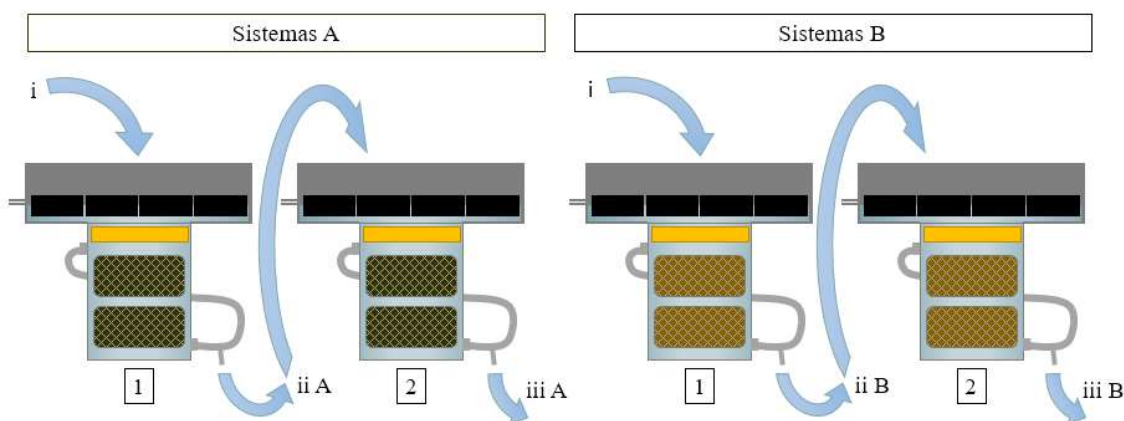


Figura 7. Esquema de la configuración de los sistemas. *Sistemas A: ánodos con biomasa al inicio del período experimental; Sistemas B: ánodos limpios; Sistemas 1: se alimentan de agua residual fresca; Sistemas 2: se alimentan de agua residual proveniente de los sistemas 1.*

Estos sistemas se han diseñado para simular el gradiente que podría producirse en un humedal construido en la dirección del flujo de agua en el que se hayan implementado unas pilas microbianas. La biomasa responsable del tratamiento del agua crece, junto con los microorganismos exoelectrógenos (EX), entre la grava. A su vez, la malla de acero inoxidable que la envuelve actúa como colector de los electrones que liberan los EX de la oxidación de la

materia orgánica y el cableado externo permite que estos circulen hasta la cámara catódica, gracias a la fuerza electromotriz, donde finalmente se produce la reducción del oxígeno.

4.1.3. Condiciones operacionales

El agua que alimenta los sistemas se trata de agua residual urbana real recogida directamente de la red de saneamiento municipal. Concretamente, se recoge desde un punto cercano al edificio D1 de la Escuela de Caminos desde donde se bombea directamente al laboratorio. Una vez ahí, el agua sedimenta durante 3 horas en un tanque antes de ser utilizada para la alimentación de los sistemas.

Como se ha comentado en el apartado anterior, los sistemas se han alimentado en *batch* durante 7 meses cada 48h (abril a octubre, excluyendo el período vacacional de agosto).

4.1.4. Métodos analíticos

4.1.4.1. Demanda química de oxígeno

La demanda química de oxígeno (DQO) mide la cantidad de oxígeno equivalente a la materia orgánica que contiene una muestra que es susceptible a ser oxidada mediante un oxidante químico fuerte. Se expresa en miligramos de oxígeno por litro de muestra. Así, la DQO permite caracterizar la cantidad de materia orgánica que contiene una muestra dada.

Esta técnica se ha usado tanto para caracterizar los sistemas (determinar la carga orgánica (ORL, *organic loading rate*) y la DQO eliminada) como para caracterizar el agua residual que alimenta los sistemas previamente a los test de actividad.

El método utilizado para la determinación de la DQO es el método colorimétrico de reflujo cerrado descrito en APHA-AWWA-WEF (2012), en el que se usa el dicromato potásico como agente oxidante.

Los equipos utilizados en estos análisis han sido una placa térmica (Bloc Digest 20, J.P. Selecta) para la digestión de las muestras y un fotómetro (MD600, Lovibond) para la lectura de los resultados.

Toma de muestras

Para la caracterización de los sistemas se ha analizado el influente y el efluente de los sistemas semanalmente hasta un total de trece semanas. Las muestras (de unos 30 ml aproximadamente) fueron tomadas en el momento antes de iniciar un nuevo *batch* de alimentación a través de la

válvula de salida de cada uno de los sistemas (ver Figura 6A) y del tanque de distribución. Los puntos de muestreo se pueden ver señalizados en la Figura 7 y se describen en la siguiente tabla (Tabla 2).

Tabla 2. *Influente y efluente de cada sistema en relación a la Figura 7.*

	Influente	Efluente
A1	i ¹	iiA
A2	iiA	iiiA
B1	i ¹	iiB
B2	iiB	iiiB

¹Proviene del tanque de distribución

Para la caracterización del agua residual utilizada en los test de actividad, se recogieron varios litros de agua residual de la que se analizó una muestra por duplicado y posteriormente se congeló el resto (en volúmenes de 1 L) a -20°C hasta el día de su uso. El ensayo de DQO se repitió por duplicado también después de haber congelado y descongelado el agua para comprobar que seguía manteniendo la misma calidad.

4.1.4.2. *Sólidos volátiles*

Debido a la concentración de materia orgánica que contiene el agua residual que alimenta a cada uno de los sistemas y a las diferencias que ya existían entre ellos en el momento de inicio del trabajo, se espera que entre los sistemas exista una diferencia en la cantidad de biomasa que contienen. Para evaluarlo se ha analizado la cantidad de sólidos volátiles que hay adheridos en los ánodos de cada pila mediante el procedimiento descrito en APHA-AWWA-WEF (2012).

Los equipos utilizados en este análisis son un horno de mufla (Select-Horn, J.P. Selecta) y una estufa de secado (J.P. Selecta).

Toma de muestras

Para recuperar la mayor cantidad de sólidos que están adheridos en los ánodos se ha extraído toda la grava del interior de la malla metálica que los conforma. Posteriormente, ésta ha sido lavada con un volumen conocido de agua desionizada para extraer la mayor cantidad posible de sólidos.

Es esta agua el que se ha filtrado mediante un equipo de filtración con bomba y filtros de fibra de vidrio (Grade GF6 Glass Fiber Filter Paper, Whatman/GE Healthcare) de entre 1 y 3 μm de poro. En la Figura 8 se puede observar el detalle del procedimiento.

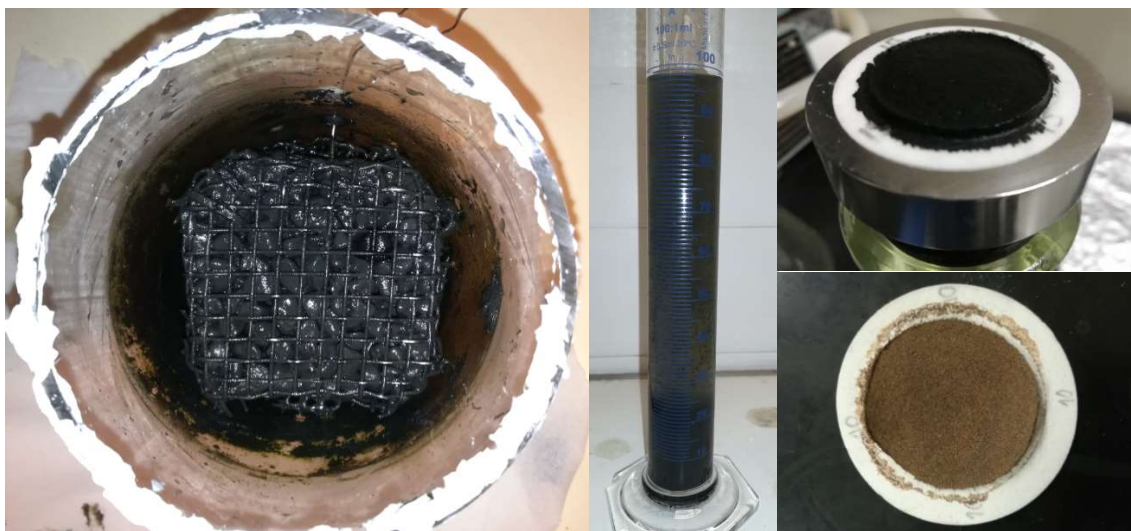


Figura 8. Detalle del análisis de sólidos volátiles. De izquierda a derecha y superior a inferior se puede observar la grava de la cámara anódica al final del período experimental, el volumen de agua a filtrar en el que se ha lavado la grava y los filtros húmedo y después del horno de mufla.

Paralelamente, se ha pesado la cantidad de grava que formaba parte de cada sistema.

4.1.5. Test de actividad mediante la hidrólisis de FDA

4.1.5.1. Adaptación y puesta a punto

Desde que, en 1982, Schnürer y Rosswall propusieron un protocolo para la determinación de la actividad microbiana mediante la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA), ésta técnica ha sido usada en muchos otros estudios para la misma finalidad, adaptando y modificando en algunos casos el protocolo. En líneas generales, se trata de incubar la muestra en tampón fosfato y FDA durante varias horas a una temperatura determinada. Seguidamente se para la reacción, habitualmente mediante un reactivo como la acetona, a un tiempo determinado y se lee la absorbancia de la fluoresceína liberada a 490 nm.

Aunque la mayoría de estudios siguen el protocolo establecido por Schnurer & Rosswall (1982), se suele variar la concentración de FDA inicial, las horas de incubación de la muestra en la solución de reacción y el reactivo usado para detener la hidrólisis de FDA, según el objetivo del trabajo o el tipo de muestras estudiadas (ver apartado 3.5), pero los resultados se expresan siempre

como el total de fluoresceína liberada al final del ensayo en relación a la cantidad o volumen de muestra analizada. En cambio, Weber & Legge (2011), para determinar la actividad microbiana en un mesocosmos de un humedal construido, calculan la utilización de FDA como el promedio de los incrementos de la fluoresceína (FL) entre los 8 y los 15 minutos de incubación.

Debido a las características de los sistemas que se han utilizado en la primera parte del trabajo, ha sido necesario poner a prueba y adaptar algunos de los elementos del ensayo:

1. La necesidad de detener la reacción antes de leer la absorbancia. Ya que se espera una actividad muy baja en alguno de los sistemas, es necesario saber si la adición de un reactivo en la muestra diluye tanto la fluoresceína que se encuentre por debajo del límite de detección.
2. Determinar el momento en el que se realizará el test de actividad en relación a los ciclos de alimentación. Puesto que los sistemas funcionan en discontinuo, es necesario determinar si el tiempo transcurrido desde su alimentación afecta la actividad y, de ser así, escoger un tiempo determinado para todos los ensayos para no añadir variabilidad extra.

Para comprobar los puntos anteriores y determinar el protocolo final a seguir, se realizaron las siguientes pruebas:

1. Con el sistema en el que se espera una menor actividad (B2) debido a menor presencia de biomasa y materia orgánica, se realizaron test de actividad siguiendo un protocolo modificado de Weber & Legge (2011), en el que se usó la acetona como reactivo para detener la reacción de hidrólisis de FDA. El objetivo fue determinar si la adición de este reactivo disminuía tanto la absorbancia como para no observar ningún incremento en la FL liberada.
2. Por otro lado, para conocer en qué momento deberían realizarse los ensayos de actividad (siguiendo Weber & Legge (2011) y sin detener la reacción) se usó el sistema en el que se espera mayor actividad y variación de la misma debido a la cantidad de materia orgánica disponible en las horas previas al test, el sistema A1. Se realizaron ensayos por duplicado 1h, 15h y 72 h después de haber añadido agua residual fresca al sistema. En todos los test se usó la misma agua residual, recogida el mismo día y almacenada en congelación hasta el día de su uso, para evitar que la variación en la actividad fura debida a la variación en las características del agua y no al tiempo transcurrido desde su adición.

Gracias a estas pruebas (los resultados de las cuales pueden verse en el apartado de Anexos), se determinó que:

1. No es necesario el uso de ningún reactivo que detenga la reacción debido a (i) se procede a la lectura de la absorbancia inmediatamente después de coleccionar la muestra y (ii) la adición de un reactivo como la acetona provoca tanto la variación brusca del pH de la muestra y demasiada disminución de la absorbancia.
2. El momento en el que se lleva a cabo el test después de su alimentación puede afectar a los resultados, así que se realizaran todos en el mismo tiempo: aproximadamente después de 15 h del inicio de un nuevo *batch*.

El procedimiento final que se aplicó, es un procedimiento modificado de Weber & Legge (2011), que se describe a continuación.

En primer lugar, es necesario extraer el agua residual del interior del sistema en el que se realizará el test para así poder añadir la solución de reacción. Ésta consiste en 0,8 L de tampón fosfato 60 mM a pH 7,6 al que se le añade 1 mL de solución 0,4 mM de FDA (Fluorescein diacetate, 97% pure, Acros Organics) en acetona (Acetone extra pure, Scharlau), consiguiendo una concentración final de 5E-4 mM de FDA. La solución stock de FDA debe mantenerse a -20°C hasta el momento de preparar la solución de reacción. Para maximizar la mezcla en el interior del sistema durante el ensayo, se recircula la solución mediante una bomba peristáltica (Damova MP-3035-6M) a un caudal aproximado de 6,4 L/min.

Durante 50 minutos desde el inicio del test, cada 10 minutos se coge una muestra de 4 ml de solución y se filtra mediante filtros de nitrocelulosa de 0,45 µm de poro. Finalmente se mide su absorbancia a 490 nm en una cubeta de cuarzo (QS 100-10-40, Hellma Analytics) con un espectrofotómetro (Spectronic GENESYS 8, Thermo Scientific). La filtración de las muestras se ha realizado únicamente para eliminar los sólidos suspendidos que se desprenden del interior del sistema e interfieren en la absorbancia.

Una vez finalizado el ensayo, se extrae la solución de reacción del interior del sistema mediante la válvula de salida y se añade de nuevo el agua residual que contenía al inicio para minimizar la interferencia de los test en el funcionamiento habitual de la pila.

La conversión de la lectura de absorbancia a concentración de fluoresceína liberada se ha realizado mediante una curva de calibración preparada previamente. Las lecturas expresadas en concentración de fluoresceína han sido normalizadas respecto del máximo posible en el test (0,5µM en este caso). Posteriormente se ha calculado la tasa de consumo de FDA mediante el incremento de la FL entre los minutos 10 y 30 del ensayo. El valor obtenido es el que se ha utilizado como medida de la actividad heterotrófica.

4.1.5.2. Validación de la hidrólisis de FDA como método de contraste

Al cabo de 7 meses de operación de los sistemas, se realizaron los test de actividad (tal como se ha descrito en el anterior apartado) por triplicado a cada uno de ellos.

Posteriormente, se han promediado los resultados de los tres ensayos de cada sistema para obtener la actividad heterotrófica de cada uno de ellos. Este valor, es el que se ha comparado con la densidad de corriente eléctrica promedio (relativa al área superficial) producida a lo largo del tiempo y que representa la actividad de la comunidad microbiana exoelectrógena.

4.2. APLICACIÓN EN HUMEDALES CONSTRUIDOS ESCALA PILOTO

4.2.1. Información general

La segunda parte del trabajo ha consistido en llevar la comparación de la actividad eléctrica y la actividad microbiana general (medida mediante la hidrólisis de FDA) a sistemas de escala piloto, los cuales permiten reproducir de mucho más realista las condiciones de funcionamiento de un humedal real.

4.2.2. Diseño y descripción de los sistemas

El sistema utilizado en este apartado es un humedal construido de flujo subsuperficial a escala piloto en el que hay implementados tres pilas microbianas independientes, coincidiendo con el primer, segundo y tercer transectos del humedal.

El sistema consiste en una caja de PVC de 0,193 m² (55 x 35 cm) de área superficial rellena de grava granítica de entre 4 y 8 mm, excepto en la zona de entrada y la zona cercana a la salida, donde la grava es de entre 7 y 14 mm. Cada pila consiste en un ánodo compuesto de cuatro rectángulos de malla de acero inoxidable (acero inoxidable A316L grado marino, anchura de malla de 4,60 mm y diámetro de cable de 1 mm) dispuestos uno seguido de otro en perpendicular al eje del flujo de agua y separados una distancia de 4 cm entre ellos (Figura 9, C) y un cátodo de fieltro de carbono (Figura 9, D) (99,0% de pureza de carbono) de 1,27 cm de grosor y una superficie proyectada de 0,03 m². Por debajo del cátodo se encuentra una capa de lana de vidrio para evitar que el oxígeno se filtre desde el cátodo hasta el ánodo. Los dos electrodos de la pila se conectan externamente a través de una resistencia de 220 Ω (Corbella and Puigagut, 2018). El voltaje a través de la resistencia se ha monitoreado continuamente mediante un *datalogger* (CR1000, Campbell Scientific).

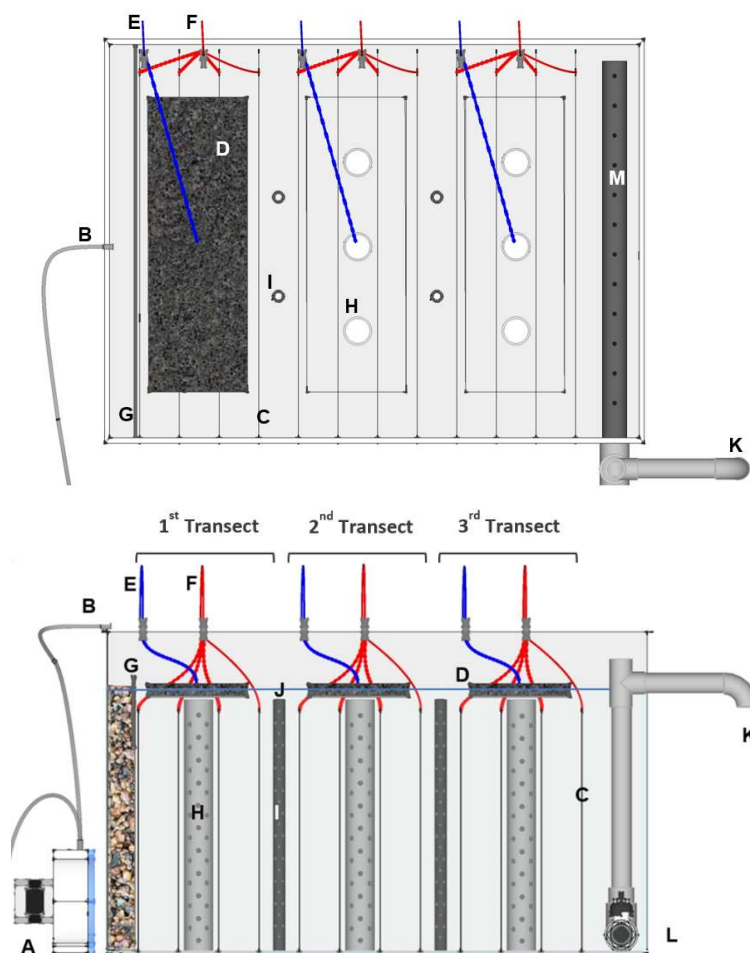


Figura 9. Vista en planta (superior) y perfil (inferior) del esquema del humedal construido escala piloto y sus componentes. A: bomba peristáltica; B: influente; C: ánodo; D: cátodo; E/F: cableado hacia el datalogger del cátodo y el ánodo, respectivamente; G: barrera de separación de la zona de entrada del humedal; H: tubos para los muestreadores de grava; I: tubos para el muestreo del agua intersticial; J: nivel de agua; K: tubo del efluente; L: drenaje del sistema; M: tubo colector del efluente.

Tal como se observa en la Figura 9, I, después del primer y segundo transectos se encuentran dos puntos intermedios de muestreo del líquido del humedal que consisten en dos tubos de plástico (1 cm de diámetro) perforados. Por último, debajo de cada uno de los cátodos se encuentran tres tubos más de plástico perforados (Figura 9, H) de 3,2 cm de diámetro (posicionados uno al centro y los otros dos a 8,5 cm de éste) que contienen, a su vez, unos muestreadores de malla plástica rellena de la misma grava que el resto del humedal y que pueden ser extraídos, en este caso, para analizar la actividad microbiana a lo largo del humedal.

4.2.3. Condiciones operacionales

En este apartado del trabajo, los sistemas también han sido alimentados con agua residual urbana real durante un período de 5 meses. Igual que en el apartado 4.1.2, el agua se recoge directamente de la red de alcantarillado municipal y es transportada al laboratorio del grupo, donde sedimenta durante tres horas en un tanque de sedimentación y, posteriormente, es bombeada hasta un tanque de distribución de 180 L. Es desde este punto desde donde el agua se distribuye a los sistemas de forma continua gracias a una red de distribución. El caudal de agua con el que se provee cada humedal está controlado por unas bombas peristálticas (Damova MP-3035-6M) conectadas a un variador de frecuencia (Toshiba VF-nC3S).

El humedal de escala piloto utilizado ha funcionado a lo largo del período a un tiempo de retención hidráulica promedio teórica de 3,7 días y una carga orgánica de $5,1 \pm 1,8$ g DQO/m²·d.

4.2.4. Muestreo y métodos analíticos

A lo largo de los 5 meses de experimentación se tomaron muestras semanalmente tanto del influente, como de los dos puntos intermedios (1/3 y 2/3 del humedal) y del efluente para realizar análisis de DQO. Todas las muestras tenían un volumen total de aproximadamente 60 mL. Las muestras de los puntos intermedios eran una mezcla de agua extraída de los dos tubos de muestreo (ver Figura 9, I) mediante una jeringa, concretamente se han recogido dos muestras de 15 ml de cada tubo: una a 5 cm de profundidad y otra a 15 cm. El análisis de la DQO se ha realizado de acuerdo a lo descrito en APHA-AWWA-WEF (2012).

4.2.5. Test de actividad mediante la hidrólisis de FDA

La actividad microbiana de los sistemas se ha determinado mediante el protocolo previamente establecido (ver apartado 4.1.5), adaptándolo a los sistemas y muestras de esta segunda parte del trabajo. Para la determinación de la actividad microbiana se han usado los tres muestradores de grava que contiene cada uno de los sistemas debajo de los cátodos (ver Figura 9, H).

En este caso se ha usado un reactor previamente construido, de 10 cm de diámetro y 28 cm de alto (Figura 10). Una vez introducidos los tres muestradores procedentes de un electrodo, se añade la solución de reacción (400 ml de tampón fosfato 60 mM pH = 7,6 con 1 ml de solución FDA en acetona 4 mM conservada a -20°C, concentración final: 10 mM de FDA), la cual se va recirculando en el reactor mediante una bomba peristáltica (Damova MP-3035-6M) conectada a un variador de frecuencia (Toshiba VF-nC3S).

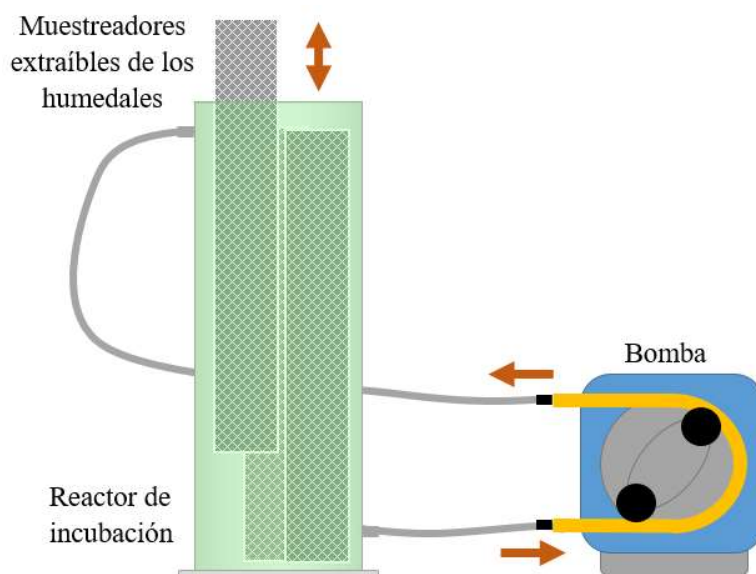


Figura 10. Esquema de los tres muestreadores extraíbles de cada transecto del humedal en el interior del reactor en el que se realizaron los test.

Una vez empezado el test, durante 50 minutos se ha recogido una muestra de la solución de reacción cada 5 minutos y se ha leído su absorbancia a 490 nm mediante un espectrofotómetro (Spectronic GENESYS 8, Thermo Scientific) y una cubeta de cuarzo (QS 100-10-40, Hellma Analytics). Al finalizar el test, se ha devuelto cada uno de los muestreadores a su sitio original y se ha limpiado el reactor mediante agua desionizada.

La conversión de las lecturas de absorbancia a concentración de fluoresceína se ha realizado mediante una curva de calibración previamente preparada.

Posteriormente, se normalizaron las lecturas con respecto a la concentración total posible de fluoresceína en el ensayo ($10\mu\text{M}$) y se calculó la tasa de consumo de FDA para todos los incrementos de tiempo entre los minutos 10 y 30. Finalmente, se ha calculado la tasa de consumo de FDA como el promedio de estos incrementos, que es lo que se ha llamado en este trabajo a la actividad heterotrófica general.

La actividad heterotrófica general de cada uno de los transectos es el valor que se ha comparado con su actividad eléctrica, calculada como el promedio de la densidad de corriente producida (respecto de la sección transversal) durante la semana anterior al test de actividad.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA

5.1.1. Caracterización de los sistemas

A lo largo del tiempo de experimentación (7 meses excluyendo agosto), se ha analizado la DQO tanto del agua de entrada como el efluente de cada uno de los sistemas. Los resultados se expresan en la siguiente tabla (Tabla 3).

Tabla 3. Carga orgánica y eliminación de DQO

	OLR ¹ (g DQO/m ² ·d)		DQO eliminada (g DQO/m ² ·d)	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
A1	8,6	2,7	5,2	2,25
A2	3,4	2,0	2,4	1,6
B1	8,6	2,7	7,1	2,25
B2	1,5	1,3	0,9	1,1

¹OLR: *Organic loading rate* (carga orgánica) recibida por cada sistema.

Los resultados obtenidos muestran que los sistemas funcionan de forma parecida a las diferentes secciones de un humedal a lo largo del flujo que sigue el agua tratada, especialmente en los sistemas A1, A2 y B2, ya que en un humedal la mayor parte de la eliminación de la DQO se lleva a cabo en el primer transecto del mismo. A diferencia de lo que podría esperarse, el sistema B1 es capaz de eliminar más cantidad de materia orgánica que el sistema A1. Esto puede ser debido a que el sistema A1 se encuentra en una fase más estable (los ánodos tenían una biomasa de un año de antigüedad), mientras que el sistema B1 podría encontrarse aún en una fase de crecimiento de biomasa.

Para comprobar si al final del experimento se había producido una diferencia de biomasa entre los sistemas, se midieron los sólidos volátiles totales que contenían los ánodos. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4. Cantidad de sólidos volátiles en cada sistema.

	Biomasa anódica (mg SSV/g grava)
A1	4,23
A2	0,91
B1	2,03
B2	0,37

Estos resultados en la caracterización de los sistemas confirman un gradiente en las condiciones en las que funciona cada uno de ellos. Desde más biomasa y mayor concentración de materia orgánica hasta menor, encontramos los sistemas A1, B1, A2 y B2.

5.1.2. Validación de la hidrólisis del FDA como método de contraste

En la primera parte del trabajo se pretendía comprobar si la hidrólisis del FDA podía estar relacionada con la corriente eléctrica que genera una pila microbiana. Es decir, si la actividad microbiana general del sistema puede relacionarse con la actividad eléctrica de la pila. Para ello se realizaron tres test de actividad en cada uno de los sistemas después de 7 meses de su puesta en marcha (excluyendo agosto), el mismo período de tiempo que se estuvo registrando la corriente eléctrica que generaron mediante un *datalogger*.

La actividad microbiana se ha calculado para cada test y sistema promediando el incremento de la concentración de fluoresceína entre los 10 y los 30 minutos, después de normalizar la concentración de cada punto al máximo posible (0,5 μ M) y, finalmente, multiplicando el valor por 1000. Así, como más actividad tenga un sistema, mayor será la tasa de consumo de FDA y, por tanto, mayor será el incremento de la concentración de fluoresceína.

Los resultados obtenidos de los test de actividad se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de los test de actividad heterotrófica general de cada sistema.

	Test 1	Test 2	Test 3	Promedio	Desviación estándar
A1	34,83	24,38	12,69	23,96	11,08
A2	3,48	24,38	13,93	13,93	10,45
B1	10,45	22,64	19,15	17,41	6,28
B2	11,94	8,71	10,45	10,36	1,62

Como se puede observar, cada sistema presenta una actividad diferenciada de la de los demás, siendo la más elevada la del sistema A1, seguido de B1, A2 y B2. Aun así, probablemente debido a que la homogeneización no fuera suficiente y a la propia variabilidad de un sistema biológico, la variabilidad interna de la actividad de cada pila es muy elevada.

Weber and Legge (2011), en evaluar la actividad microbiana que presenta el mesocosmos de un humedal construido alimentado con agua residual sintética en su fase de puesta en marcha (aproximadamente durante 6 meses), encontraron valores parecidos en los mesocosmos que habían recibido el inóculo microbiano de una planta de tratamiento de agua residual. Al final del período de evaluación, sobre los 6 meses de funcionamiento, la actividad bacteriana era de alrededor de 20. Los sistemas A1 y B, que recibían una cantidad similar de materia orgánica, han mostrado unos valores similares de actividad bacteriana general.

Por otro lado, la densidad de corriente eléctrica promedio producida durante el periodo experimental de cada uno de los sistemas se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Densidad de corriente eléctrica promedio producida por cada sistema.

	Corriente eléctrica (A/m ²)
A1	9,08E-01 ± 4,46E-01
A2	2,07E-01 ± 2,08E-01
B1	3,56E-01 ± 4,61E-01
B2	7,33E-04 ± 1,71E-03

Como se puede ver en la siguiente gráfica (Figura 11) la actividad bacteriana general y la actividad eléctrica correlacionan muy bien ($R^2 = 0,98$), aunque la variabilidad de las lecturas y también la DQO del agua de entrada a lo largo de los 7 meses haya sido muy elevada.

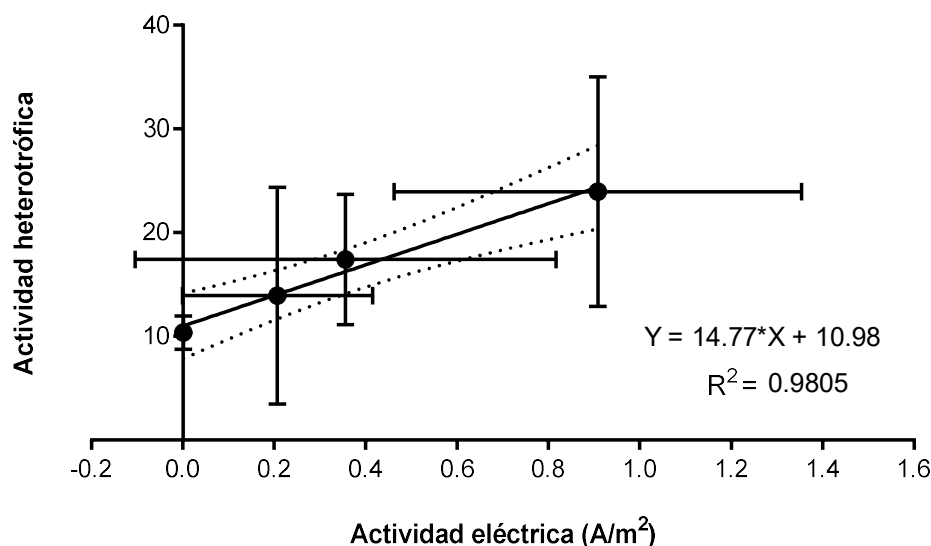


Figura 11. Gráfica de la correlación entre la actividad heterotrófica general del sistema y su actividad eléctrica.

Los resultados obtenidos muestran que la actividad de la comunidad exoelectrogénica, expresada como la densidad de corriente generada por la MFC, puede ser indicadora de la actividad heterotrófica general del humedal. Aun así, es necesario un período de estudio más largo, bajo mejores condiciones de réplica de ensayos y utilizando sistemas con condiciones más realistas de funcionamiento y operación, para poder conocer mejor el potencial de esta herramienta como indicador.

5.2. APLICACIÓN DE LA TÉCNICA

5.2.1. Observaciones generales

En este apartado se presentarán los resultados obtenidos respecto del humedal a escala piloto. De esta forma, se pretende superar algunos de los inconvenientes y limitaciones que presentaban los sistemas a escala laboratorio, como unas condiciones de funcionamiento más realistas o unas mejores condiciones de replicados.

5.2.2. Caracterización del sistema

Los ensayos de DQO han permitido determinar cuál ha sido la carga orgánica a la que se ha sometido este sistema y la cantidad de DQO que es eliminada en cada uno de los transectos del mismo. En las Tablas 7 y 8, se resumen estos resultados.

Tabla 7. Carga orgánica (g DQO/m²·d) que ha recibido cada transecto del humedal.

	Promedio	Desviación estándar
Primer tercio	5,1	1,8
Segundo tercio	2,7	1,7
Tercer tercio	2,1	1,6

Tabla 8. DQO eliminada (g DQO eliminada/m²·d) en cada transecto del humedal.

	Promedio	Desviación estándar
Primer tercio	2,8	2,1
Segundo tercio	0,8	0,7
Tercer tercio	0,2	1,6

En los HSSF la mayor parte de la materia orgánica es eliminada en el primer tercio del humedal, igual que ocurre en el sistema escala piloto aquí presentado.

5.2.3. Aplicación de la hidrólisis del FDA como método de contraste

La hidrólisis del diacetato de fluoresceína se ha utilizado en esta parte del trabajo como método de contraste a la actividad eléctrica en un CW-MFC que funciona bajo unas condiciones más reales de operación.

Para ello se ha analizado tanto la actividad microbiana general (mediante la hidrólisis del FDA) como la actividad eléctrica (mediante el registro de la corriente generada) en cada uno de los tres transectos que conforman el humedal (descritos en el apartado 4.2.1). Los test de actividad se realizaron por cuadruplicado en cada uno de los transectos, los tres primeros ensayos a lo largo de 1 mes y el cuarto dos meses más tarde.

Los resultados de actividad general que se muestran en la Tabla 9 están calculados como el promedio de todos los incrementos en la concentración de fluoresceína (después de ser normalizado a la concentración máxima, 10 μ M) entre los minutos 10 y 30 del ensayo. A este valor, multiplicado por 1000, es al que se ha llamado actividad heterotrófica general.

Tabla 9. Resultados obtenidos de los test de actividad.

	Transecto 1	Transecto 2	Transecto 3
Test 1	18,37	13,21	13,50
Test 2	9,37	9,09	5,62
Test 3	10,22	9,47	10,59
Test 4	14,90	9,84	11,43
Promedio	13,21	10,40	10,29
Desviación estándar	4,21	1,90	3,34

La actividad enzimática del primer transecto fue la más elevada en todos los test, siendo su valor promedio de $13,21 \pm 4,21$. El segundo y tercer transectos han mostrado una actividad muy similar, de $10,40 \pm 1,90$ y $10,29 \pm 3,34$, respectivamente.

En la literatura existente no se han encontrado valores de actividad microbiana que puedan compararse con los aquí descritos, principalmente por las diferencias en las condiciones de trabajo: Iasur-Kruh *et al.* (2010) se centraron en humedales verticales, en los cuales se midió la actividad después de su desmontaje al cabo de tres meses de su puesta en marcha; Gagnon *et al.* (2007) trabajaron con mesocosmos aunque realizaron los ensayos al cabo de dos meses de su puesta en marcha y Weber and Legge (2011) evaluaron la actividad en mesocosmos de 12 L de volumen. Este último estudio fue el más largo y, al cabo de 6 meses aproximadamente de su puesta en marcha, se obtuvieron valores cercanos a las 20 unidades en la actividad microbiana (calculada de la misma forma que en este trabajo), valores muy superiores a los obtenidos en el sistema escala piloto.

Por otro lado, se ha evaluado la corriente eléctrica que ha generado cada una de las pilas (coincidiendo con las tres secciones del humedal) a lo largo del tiempo de experimentación. En la siguiente tabla (Tabla 10) se muestra la actividad eléctrica promedio (expresada como la densidad

de corriente respecto del área del ánodo) que se registró la semana anterior a la realización de los test.

Tabla 10. Densidad de corriente eléctrica (en A/m^2) registrada la semana previa a cada test de actividad.

	Transecto 1	Transecto 2	Transecto 3
Test 1	2,55E-02	2,05E-02	2,05E-02
Test 2	2,31E-02	2,10E-02	2,18E-02
Test 3	2,52E-02	2,20E-02	2,20E-02
Test 4	2,42E-02	2,25E-02	2,07E-02
Promedio	2,45E-02	2,15E-02	2,12E-02
Desviación estándar	1,11E-03	8,87E-04	7,35E-04

En la siguiente gráfica (Figura 12) se puede observar la correlación obtenida entre los valores de actividad heterotrófica y eléctrica en los transectos del humedal. Cada uno de los puntos está compuesto de los valores de las cuatro réplicas del test de actividad y de la corriente eléctrica registrada en la semana anterior.

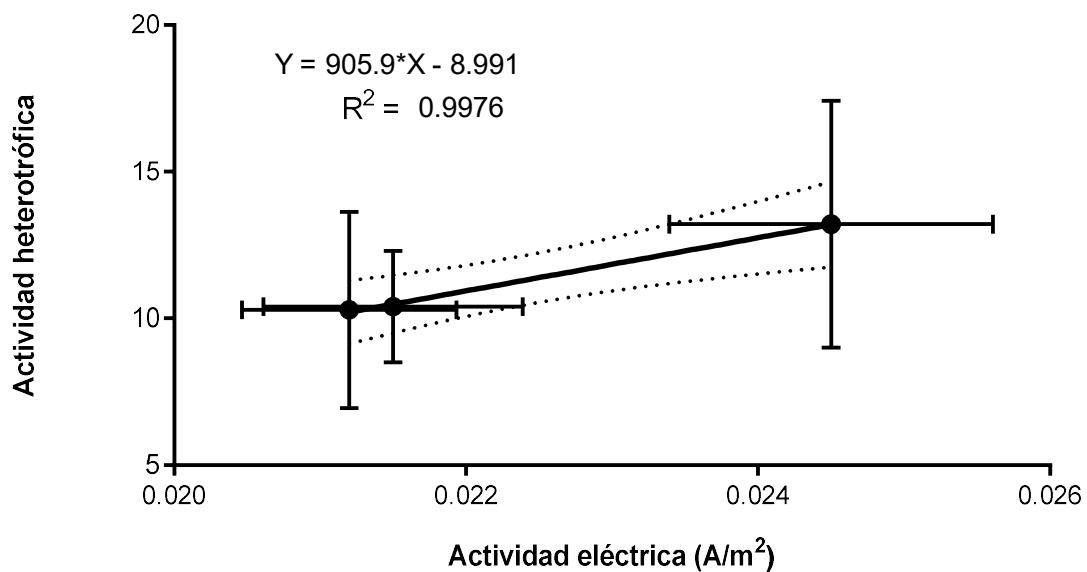


Figura 12. Correlación entre la actividad eléctrica y la actividad heterotrófica del sistema.

Igual que en los sistemas escala laboratorio, la variabilidad en los resultados es muy elevada. En este caso, una razón para ello podría ser la propia variabilidad del agua residual que alimenta los sistemas. Como los test previos a la validación de la hidrólisis de FDA indicaban, la cantidad de materia orgánica que contiene el agua residual durante las horas previas al test de actividad, afectan a los resultados del mismo. Así, si uno de los dos parámetros es más sensible a las variaciones que el otro, cabría esperar unos resultados que, analizados individualmente por test, correlacionen con menor fuerza.

Para conocer mejor la relación que existe entre ambos parámetros y ver hasta qué punto la actividad eléctrica es indicadora de la actividad general, se ha realizado el mismo análisis de datos de correlación, pero utilizando diferentes periodos temporales de actividad eléctrica. Es decir, se han comparado los resultados de los test de FDA con la densidad de corriente eléctrica promedio de diferentes periodos temporales: desde una semana anterior a los test de FDA hasta 8 semanas atrás. Los factores de correlación obtenidos en cada uno de los análisis se muestran en la siguiente gráfica (Figura 13).

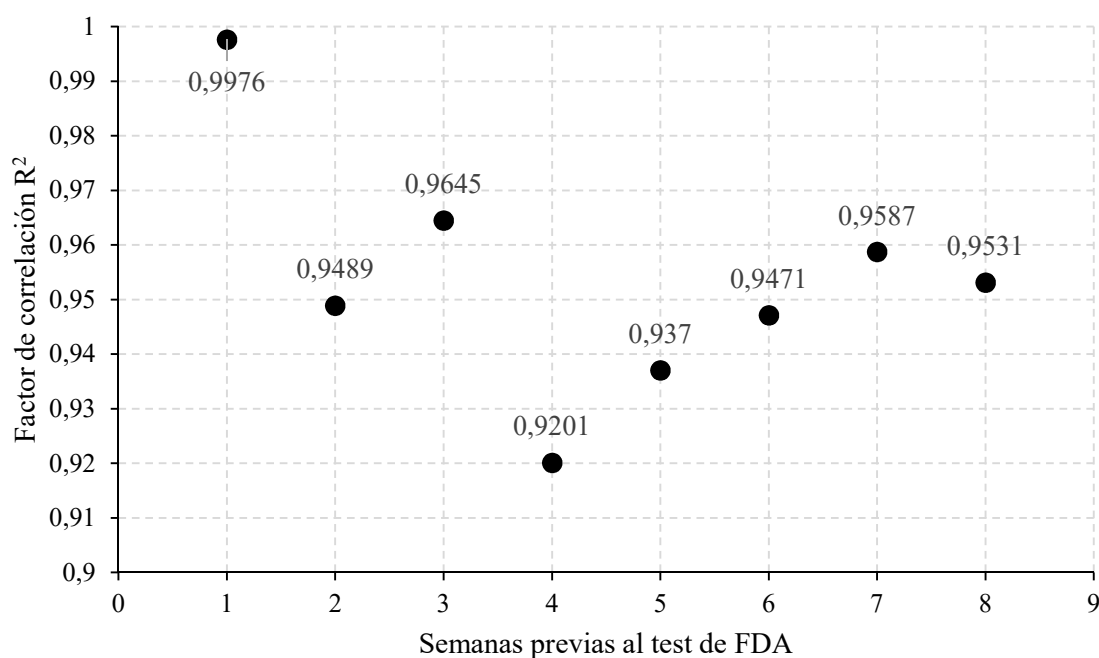


Figura 13. Factores de correlación entre la utilización del FDA y la corriente eléctrica obtenida en las semanas previas al test de actividad.

Como se puede observar en la gráfica, en todos los casos la correlación entre ambos parámetros es muy buena ($R^2 > 0,9$), aunque el mejor resultado es el que se obtiene con los datos de la semana

anterior. Las diferencias que se observan entre las semanas previas 2 a la 8 pueden ser debidas a variaciones en la corriente eléctrica registrada ya sea por razones eléctricas o por variaciones en el agua residual. Aun así, no se observa una tendencia a la disminución del factor de correlación, señalando una menor capacidad de la corriente como indicadora de la actividad bacteriana, seguramente debido al hecho de que el sistema se encuentra en un estado relativamente estable en este período de tiempo.

Finalmente, cabe destacar que, como se ha mencionado anteriormente, es necesario realizar más estudios con los que se puedan comparar los resultados encontrados, además de complementarlos con estudios más prolongados en los que se puedan incluir diferentes fases de la vida de un humedal, mejores condiciones de replicación o más sistemas, además de poder incluir datos de materia orgánica en el agua que permitan determinar en qué medida influye los resultados del análisis.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

A lo largo de este trabajo se ha evaluado la posibilidad de que la actividad de una pequeña parte de la comunidad microbiana que vive y colabora en el tratamiento del agua residual, los microorganismos exoelectrogénicos, sea representativa de la actividad heterotrófica general que se produce durante el tratamiento del agua residual doméstica en un humedal construido.

Para abordar este objetivo se ha evaluado la posibilidad de utilizar la hidrólisis del FDA como medida de la actividad general microbiana, ya que este método se basa en la hidrólisis del compuesto mediante enzimas ampliamente extendidas en la diversidad microbiana, además de ser un ensayo rápido, sencillo y sensible. Una vez evaluada y puesta a punto la técnica para ser aplicada en los sistemas presentados en el trabajo, se ha utilizado para comprobar si la actividad microbiana general y la actividad eléctrica están relacionadas.

Los resultados obtenidos tanto en los sistemas de escala laboratorio como el de escala piloto han mostrado que ambas actividades correlacionan muy bien (con valores de $R^2 > 0,9$). Aun así, se debe tener en cuenta que los sistemas utilizados presentan ciertas limitaciones, por ejemplo, una relativamente baja reproductibilidad de los test de actividad en los sistemas de escala laboratorio o disponer de un solo sistema de escala piloto.

Así, para dar más solidez a los resultados, sería necesario poder evaluar el comportamiento de ambos parámetros en un rango más amplio de valores, así como comprobar la relación que existe entre la DQO disponible en el agua y la cantidad de biomasa con ambos tipos de actividad evaluados, además de períodos de experimentación más largos y con más ensayos. Debido a que la evaluación de estos dos tipos de actividad en conjunto es un campo aún desconocido, la realización de otros estudios permitiría contrastar y complementar los datos que se han obtenido aquí.

Aun así, la corriente eléctrica generada por una MFC parece ser una herramienta prometedora para el monitoreo en continuo de la actividad bacteriana y, por lo tanto, del grado de eficiencia del tratamiento biológico, que, además, no consume tiempo, recursos y funciona de forma in-situ.

REFERENCIAS

- Adam, G. and Duncan, H. (2001) 'Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils', *Soil Biology & Biochemistry*, 33, pp. 943–951. doi: 10.1016/S0038-0717(00)00244-3.
- APHA-AWWA-WEF (2012) *Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation*. Washington, D.C.: American Public Health Association.
- Baptista, J. D. C. *et al.* (2003) 'Microbial mechanisms of carbon removal in subsurface flow wetlands', *Water Science and Technology*, 48(5), pp. 127–134. doi: 10.2166/wst.2003.0298.
- Battin, T. J. (1997) 'Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity in natural stream sediment biofilms', *Science of the Total Environment*, 198(1), pp. 51–60. doi: 10.1016/S0048-9697(97)05441-7.
- Bond, D. R. *et al.* (2002) 'Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments', *Science*, 295(5554), pp. 483–485. doi: 10.1126/science.1066771.
- Caselles-Osorio, A. and García, J. (2007) 'Impact of different feeding strategies and plant presence on the performance of shallow horizontal subsurface-flow constructed wetlands', *Science of the Total Environment*, 378(3), pp. 253–262. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.02.031.
- Corbella, C. and Puigagut, J. (2018) 'Improving domestic wastewater treatment efficiency with constructed wetland microbial fuel cells: Influence of anode material and external resistance', *Science of the Total Environment*, 631–632, pp. 1406–1414. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.084.
- Doherty, L. *et al.* (2015) 'A review of a recently emerged technology: Constructed wetland - Microbial fuel cells', *Water Research*, 85(August), pp. 38–45. doi: 10.1016/j.watres.2015.08.016.
- Faulwetter, J. L. *et al.* (2009) 'Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review', *Ecological Engineering*, pp. 987–1004. doi: 10.1016/j.ecoleng.2008.12.030.
- Fontvieille, D. A., Outaguerouine, A. and Thevenot, D. R. (1992) 'Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: Application to activated sludges', *Environmental Technology (United Kingdom)*, 13(6), pp. 531–540. doi: 10.1080/09593339209385181.

- Gagnon, V. *et al.* (2007) 'Influence of macrophyte species on microbial density and activity in constructed wetlands', in *Water Science and Technology*, pp. 249–254. doi: 10.2166/wst.2007.510.
- García, J. *et al.* (2003) 'Spatial variations of temperature, redox potential, and contaminants in horizontal flow reed beds', *Ecological Engineering*, 21(2–3), pp. 129–142. doi: 10.1016/j.ecoleng.2003.10.001.
- García, J. *et al.* (2010) 'Contaminant removal processes in subsurface-flow constructed wetlands: A review', *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, pp. 561–661. doi: 10.1080/10643380802471076.
- Garcia, J. and Corzo, A. (2008) 'Depuración con Humedales Construidos', *Universidad Politecnica de Cataluña*, pp. 1–96.
- Gonzalez del Campo, A. *et al.* (2013) 'Short-term effects of temperature and COD in a microbial fuel cell', *Applied Energy*, 101, pp. 213–217. doi: 10.1016/j.apenergy.2012.02.064.
- Guilbault, G. G. and Kramer, D. N. (1964) 'Fluorometric Determination of Lipase, Acylase, Alpha-and Gamma-Chymotrypsin and Inhibitors of These Enzymes', *Analytical Chemistry*, 36(2), pp. 409–412. doi: 10.1021/ac60208a052.
- Iasur-Kruh, L. *et al.* (2010) 'Microbial population and activity in wetland microcosms constructed for improving treated municipal wastewater', *Microbial Ecology*. Springer-Verlag, 59(4), pp. 700–709. doi: 10.1007/s00248-009-9611-z.
- Jadhav, G. S. and Ghangrekar, M. M. (2009) 'Performance of microbial fuel cell subjected to variation in pH, temperature, external load and substrate concentration', *Bioresource Technology*, 100(2), pp. 717–723. doi: 10.1016/j.biortech.2008.07.041.
- Jung, R. K. *et al.* (2008) 'Analysis of ammonia loss mechanisms in microbial fuel cells treating animal wastewater', *Biotechnology and Bioengineering*, 99(5), pp. 1120–1127. doi: 10.1002/bit.21687.
- Kadlec, R. H. and Wallace, S. D. (2009) *Treatment Wetlands, Second Edition*. Second Edi, *Treatment Wetlands, Second Edition*. Second Edi. doi: 10.1201/9781420012514.
- Kaku, N. *et al.* (2008) 'Plant/microbe cooperation for electricity generation in a rice paddy field', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(1), pp. 43–49. doi: 10.1007/s00253-008-1410-9.
- Katuri, K. P. *et al.* (2011) 'Microbial fuel cells meet with external resistance', *Bioresource Technology*, 102(3), pp. 2758–2766. doi: 10.1016/j.biortech.2010.10.147.

- Kim, B. H. *et al.* (2003) 'Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell', *Biotechnology Letters*, 25(7), pp. 541–545. doi: 10.1023/A:1022891231369.
- Liu, S. *et al.* (2014) 'Bio-cathode materials evaluation and configuration optimization for power output of vertical subsurface flow constructed wetland - Microbial fuel cell systems', *Bioresource Technology*, 166, pp. 575–583. doi: 10.1016/j.biortech.2014.05.104.
- Logan, B. E. *et al.* (2006) 'Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology', *Environmental Science & Technology*, 40(17), pp. 5181–5192. doi: 10.1021/es0605016.
- Logan, B. E. and Rabaey, K. (2012) 'Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies', *Science*, 337(6095), pp. 686–689. doi: 10.1126/science.1216852.
- Di Lorenzo, M. *et al.* (2009) 'A single-chamber microbial fuel cell as a biosensor for wastewaters', *Water Research*, 43(13), pp. 3145–3154. doi: 10.1016/j.watres.2009.01.005.
- Lu, N. *et al.* (2009) 'Electricity generation from starch processing wastewater using microbial fuel cell technology', *Biochemical Engineering Journal*, 43(3), pp. 246–251. doi: 10.1016/j.bej.2008.10.005.
- Min, B. and Logan, B. E. (2004) 'Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell', *Environmental Science and Technology*, 38(21), pp. 5809–5814. doi: 10.1021/es0491026.
- Molle, P. *et al.* (2005) 'How to treat raw sewage with constructed wetlands: an overview of the French systems', *Water Science and Technology*, 51(9), pp. 11–21. doi: 10.2166/wst.2005.0277.
- Nevin, K. P. *et al.* (2008) 'Power output and columbic efficiencies from biofilms of *Geobacter sulfurreducens* comparable to mixed community microbial fuel cells', *Environmental Microbiology*, 10(10), pp. 2505–2514. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01675.x.
- Nguyen, L. M. (2000) 'Organic matter composition, microbial biomass and microbial activity in gravel-bed constructed wetlands treating farm dairy wastewaters', *Ecological Engineering*, 16(2), pp. 199–221. doi: 10.1016/S0925-8574(00)00044-6.
- Oon, Y. L. *et al.* (2015) 'Hybrid system up-flow constructed wetland integrated with microbial fuel cell for simultaneous wastewater treatment and electricity generation', *Bioresource Technology*, 186, pp. 270–275. doi: 10.1016/j.biortech.2015.03.014.
- Peixoto, L. *et al.* (2011) 'In situ microbial fuel cell-based biosensor for organic carbon',

- Bioelectrochemistry*, 81(2), pp. 99–103. doi: 10.1016/j.bioelechem.2011.02.002.
- Puigagut, J. *et al.* (2007) ‘Subsurface-flow constructed wetlands in Spain for the sanitation of small communities: A comparative study’, *Ecological Engineering*, 30(4), pp. 312–319. doi: 10.1016/j.ecoleng.2007.04.005.
- Rabaey, K. *et al.* (2007) ‘Microbial ecology meets electrochemistry: Electricity-driven and driving communities’, *ISME Journal*, pp. 9–18. doi: 10.1038/ismej.2007.4.
- Rabaey, K. and Verstraete, W. (2005) ‘Microbial fuel cells: Novel biotechnology for energy generation’, *Trends in Biotechnology*, pp. 291–298. doi: 10.1016/j.tibtech.2005.04.008.
- Reimers, C. E. *et al.* (2001) ‘Harvesting Energy from the Marine Sediment–Water Interface’, *Environmental Science & Technology*, 35(1), pp. 192–195. doi: 10.1021/es001223s.
- Schnurer, J. and Rosswall, T. (1982) ‘Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter’, *Applied and Environmental Microbiology*, 43(6), pp. 1256–1261. doi: 0099-2240/82/061256-06\$02.00/0.
- Srivastava, P., Yadav, A. K. and Mishra, B. K. (2015) ‘The effects of microbial fuel cell integration into constructed wetland on the performance of constructed wetland’, *Bioresource Technology*, 195, pp. 223–230. doi: 10.1016/j.biortech.2015.05.072.
- Truu, M., Juhanson, J. and Truu, J. (2009) ‘Microbial biomass, activity and community composition in constructed wetlands’, *Science of the Total Environment*, 407(13), pp. 3958–3971. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.11.036.
- Venkata Mohan, S., Veer Raghavulu, S. and Sarma, P. N. (2008) ‘Biochemical evaluation of bioelectricity production process from anaerobic wastewater treatment in a single chambered microbial fuel cell (MFC) employing glass wool membrane’, *Biosensors and Bioelectronics*, 23(9), pp. 1326–1332. doi: 10.1016/j.bios.2007.11.016.
- Villaseñor, J. *et al.* (2013) ‘Operation of a horizontal subsurface flow constructed wetland - Microbial fuel cell treating wastewater under different organic loading rates’, *Water Research*, 47(17), pp. 6731–6738. doi: 10.1016/j.watres.2013.09.005.
- Vymazal, J. (2007) ‘Removal of nutrients in various types of constructed wetlands’, *Science of the Total Environment*, 380(1–3), pp. 48–65. doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.09.014.
- Vymazal, J. (2011) ‘Constructed wetlands for wastewater treatment: Five decades of experience’, *Environmental Science and Technology*, 45(1), pp. 61–69. doi: 10.1021/es101403q.
- Wang, J. *et al.* (2016) ‘Microbial community structure of different electrode materials in constructed wetland incorporating microbial fuel cell’, *Bioresource Technology*, 221, pp.

697–702. doi: 10.1016/j.biortech.2016.09.116.

Weber, K. P. and Legge, R. L. (2011) ‘Dynamics in the bacterial community-level physiological profiles and hydrological characteristics of constructed wetland mesocosms during start-up’, *Ecological Engineering*. Elsevier B.V., 37(5), pp. 666–677.

doi: 10.1016/j.ecoleng.2010.03.016.

Xu, L. *et al.* (2017) ‘Energy capture and nutrients removal enhancement through a stacked constructed wetland incorporated with microbial fuel cell’, *Water Science and Technology*, 76(1), pp. 28–34. doi: 10.2166/wst.2017.168.

Yadav, A. K. *et al.* (2012) ‘Performance assessment of innovative constructed wetland-microbial fuel cell for electricity production and dye removal’, *Ecological Engineering*. Elsevier B.V., 47, pp. 126–131. doi: 10.1016/j.ecoleng.2012.06.029.

Zhao, Y. *et al.* (2013) ‘Preliminary investigation of constructed wetland incorporating microbial fuel cell: Batch and continuous flow trials’, *Chemical Engineering Journal*, 229, pp. 364–370. doi: 10.1016/j.cej.2013.06.023.

AGRADECIMIENTOS

En primer lloc, voldria agrair al meu tutor de la tesina de màster, en Jaume Puigagut, l'haver-me ofert la oportunitat de treballar en el GEMMA i formar part del seu equip, per haver confiat en mi i ser un excel·lent director i font d'inspiració. Moltes gràcies, Jaume.

También me gustaría agradecer a mis compañeros de equipo, Marco y Manu, con los que he trabajado codo a codo durante todo este tiempo, haberme ayudado en todo lo que haya podido necesitar. A vosotros y a todos los compañeros del GEMMA, gracias por hacerme la estancia aquí mucho más alegre, acogerme como una más del grupo y haber sido mis compañeros tanto en lo profesional como en lo personal.

Per últim, m'agradaria agrair a la meva família, especialment pares i germanes, el vostre suport incondicional i inestimable. Gràcies per escoltar-me, guiar-me i, en definitiva, estar sempre al meu costat.

